Bestimmung von Progesteron im Blut weiblicher Rinder vor und nach Behandlung mit Antisera gegen Luteinisierungshormon bzw. Prolaktin

Richard Rainer Bopp

1972

Dissertationsdruck · W. Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuss-Pl. 3

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Bestimmung von Progesteron im Blut weiblicher Rinder vor und nach Behandlung mit Antisera gegen Luteinisierungshormon bzw. Prolaktin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Richard Rainer Bopp

aus Augsburg

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. J. Boessneck

Referent: Professor Dr. H. Karg

Korreferent: Priv. Doz. Dr. H. Bostedt

Tag der Promotion: 14. Juli 1972

MEINEN GROSSELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0030

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Vorbemerkung 1

2. Literaturteil 2
   2.1. Chemische Struktur, Biosynthese, Stoffwechsel und und Ausscheidung von Progesteron 2
   2.2. Progesteronproduzierende Organe..... 6
      2.2.1. Corpus Luteum 6
      2.2.2. Placenta..... 7
      2.2.3. Nebennierenrinde (NNR) 9
   2.3. Regulation der Progesteronbiosynthese 9
      2.3.1. allgemeines Prinzip 9
      2.3.2. bisher bekannte und experimentell nachgewiesene Regulationsmechanismen 14
         2.3.2.1. Stellung der Gonadotropine 14
         2.3.2.2. Bedeutung von Prolaktin 25
         2.3.2.3. Bedeutung des luteolytischen Faktors 28
      2.3.3. Spezielle Befunde beim Rind 32
         2.3.3.1. während des Zyklus 33
         2.3.3.2. während der Trächtigkeit 39

3. Methodischer Teil 41
   3.1. Tiermaterial und Versuchsplan 41
   3.2. Charakterisierung der Antisera 42
   3.3. Möglichkeiten zur Bestimmung von Progesteron in niedrigen Konzentrationsbereichen..... 46
      3.3.1. chemisch-physikalische Verfahren 46
      3.3.2. biochemische Verfahren 47
         3.3.2.1. Prinzip der Protein-Bindungsreaktion 47
         3.3.2.2. Verwendung von Plasmaproteinen als Bindungsprotein 5o
         3.3.2.3. Verwendung von Antikörpern als Bindungsprotein 54

Seite

3.4. Angewandte Verfahren zur Bestimmung von Progesteron 57
3.4.1. Material und Reagentien 57
3.4.2. Verfahren bei Verwendung von Transcortin als Bindungsprotein 6o
3.4.2.1. Vorversuche 6o
3.4.2.1.1. Charakterisierung des Transcortins verschiedenen Ursprungs 6o
3.4.2.1.1.1. Verfahren zur Bestimmung der Bindungskapazität 61
3.4.2.1.1.2. Ansatz der Transcortinlösung 65
3.4.2.1.2. Durchführung der Protein-Bindungsreaktion unter Verwendung von Florisil bzw. Holzkohle als Adsorbentien 66
3.4.2.1.3. Anwendung eines Extraktionsganges mit bzw. ohne dünnschichtchromatographischer Isolierung von Progesteron 69
3.4.2.2. Beschreibung des Arbeitsganges 73
3.4.2.2.1. Extraktionsgang 73
3.4.2.2.2. Durchführung der Protein-Bindungsreaktion 74
3.4.2.2.3. Auswertung der Protein-Bindungsreaktion 75
3.4.2.2.4. Beurteilungskriterien 77
3.4.3. Verfahren bei Verwendung von Antikörpern als Bindungsprotein 82

4. Ergebnisse 87
4.1. Ergebnisse bei Anwendung eines Anti-LH-Serums 87
4.2. Ergebnisse bei Anwendung eines Anti-Prolaktin-Serums ... 1o8

Seite

5. Diskussion 121
5.1. Diskussion der angewandten Methoden 121
5.2. Diskussion der Ergebnisse 122

6. Zusammenfassung 127
Summary 128

7. Literaturverzeichnis..... 129
Lebenslauf

1. V o r b e m e r k u n g

Die moderne Haustierhaltung ist einem ständigen und bis heute noch nicht abgeschlossenen Umwandlungsprozeß unterzogen, der auf die Industrialisierung auch dieses Produktionszweiges hinzielt. Dabei werden bereits jetzt im Rahmen der Tierproduktion Wirkstoffe eingesetzt, mit denen insbesondere eine gezielte Steuerung des Fortpflanzungsgeschehens bewirkt werden soll. Es zeigte sich jedoch, daß - wohl aufgrund mangelnder detaillierter Erkenntnisse über physiologische Vorgänge der Sexualfunktionen - nur mit Einschränkungen Erfolge zu verzeichen waren.

Neben diesen angewandten Gesichtspunkten für die Biotechnik, sind endokrinologische Forschungen beim Rind, als einem gerade für Zyklusuntersuchungen sehr geeigneten " Versuchstier ", auch allgemein von erkenntnistheoretischem Interesse.

Die vorliegende Arbeit sollte dazu dienen, weitere Erkenntisse hierbei zu erbringen.

2. L i t e r a t u r t e i l

2.1. Chemische Struktur, Biosynthese, Stoffwechsel und Ausscheidung von Progesteron

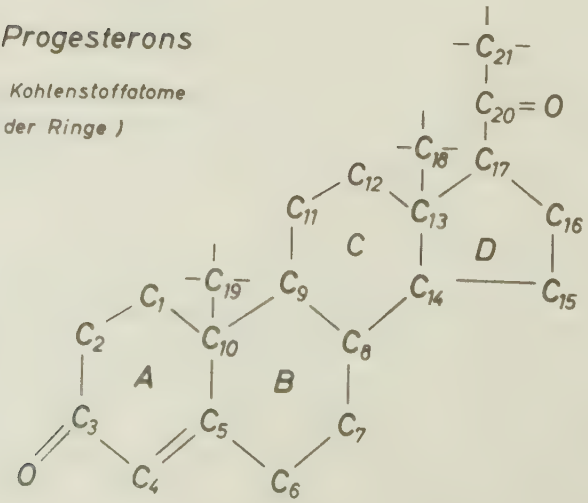
Progesteron gehört zur großen Gruppe der hormonalen Steroide, die sich in ihrer chemischen Grundstruktur vom Steran (Cyclopentanoperhydrophenanthren) herleiten.
Je nach Anzahl der C-Atome im Molekül, lassen sich die Steroidhormone in 3 Gruppen einteilen:

1. Die Östrogene mit 18 Kohlenstoff-Atomen und einem phenolischen A-Ring als Charakteristikum.
2. Die Androgene mit 19 Kohlenstoff-Atomen.
3. Die Gestagene und Corticoide mit 21 Kohlenstoff-Atomen.

Abb. 1

Struktur des Progesterons

(Numerierung der Kohlenstoffatome und Bezeichnung der Ringe)



Progesteron ist der wichtigste Vertreter der unter 3. aufgeführten Gestagene. Seine Isolierung gelang erstmals BUTENANDT und Mitarbeitern im Jahre 1934. Die chemische Struktur von Progesteron ist in Abb. 1 dargestellt.

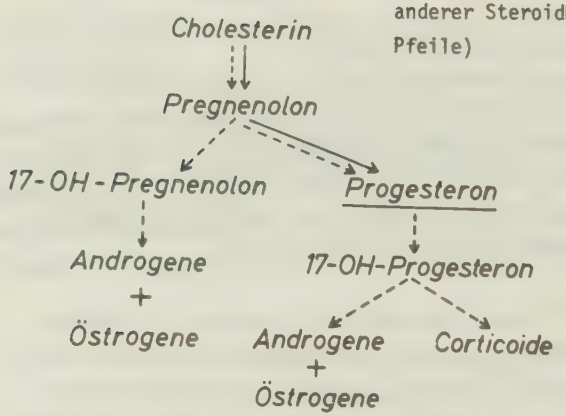
Die Summenformel dieser Verbindung lautet $C_{21}H_{30}O_2$. Wie aus der Abbildung ersichtlich, sind für dieses Molekül Ketogruppen an Kohlenstoffatom Nr. 3 und Nr. 2o, sowie eine Doppelbindung in dem damit ungesättigten A-Ring zwischen C-4 und C 5 charakteristisch. Aus diesem Aufbau des Progesteron-Moleküls ergibt sich seine exakte chemische Bezeichnung: Pregn-4-en-3, 2o-dion (KARLSON,197o).

Die Biosynthese des Progesterons geht über Cholesterin. Ursprüngliches Ausgangsmaterial ist jedoch das Acetyl-CoA (aktivierte Essigsäure), aus dem über eine Reihe von Zwischenstufen (Mevalonsäure, Isopentenyl-pyrophosphat, Farnesyl-pyrophosphat, Squalen, Lanosterin) das Cholesterin entsteht. Die oxydative Verkürzung der Cholesterinseitenkette geschieht durch Hydroxylierung an C-2o und C-22 und Abspaltung der Restkette als Isocapronaldehyd, wobei Pregnenolon entsteht. Durch Dehydrierung entsteht schließlich die biologisch wichtige Schlüsselsubstanz Progesteron (SHIMIZU und Mitarbeiter,196o; MILLER und TURNER, 1963; KARLSON, 197o). Neben seiner zentralen Stellung im Fortpflanzungsgeschehen des weiblichen Individiums ist Progesteron gleichzeitig eine wichtige Vorstufe in der Biosynthese anderer Sexualhormone und der Corticoide (EIK-NES und HALL, 1962; WELIKY und ENGEL, 1962; DORFMAN und UNGAR, 1965; KARLSON, 197o). Die Biosynthese, sowie die zentrale Stellung und Schlüsselfunktion des Progesterons sind in Abb. 2 dargestellt.

Nach Abgabe aus dem progesteronproduzierenden Zellen direkt in die Blutbahn (Prinzip der inkretorischen Sekretion - TURNER, 1966), wird der weitere Stoffwechsel von Progesteron, wie auch der anderen Steroide, durch das Vorhandensein spezifischer Plasmarezeptorproteine im Blut erheblich beeinflußt (WESTPHAL, 1971). Es handelt sich bei diesen Plasma-

Abb. 2

Biosynthese des Progesterons im Corpus luteum (ausgezogene Pfeile) und seine Stellung im Syntheseweg anderer Steroidhormone (unterbrochene Pfeile)



rezeptor-Proteinen - wie auch im Kap. 3.3.2.2. dargelegt um bestimmte Globuline, denen neben einer reinen Vehikelfunktion auch eine funktionell-regulative Bedeutung zukommt.

Die Eigenschaften dieser Proteine weisen gewisse speziesbedingte quantitative Unterschiede auf, insbesondere ist aber ihre Konzentration von physiologischen und pathologischen Zuständen (Alter, Geschlecht, Gravidität, durchgeführte Therapien) abhängig (WESTPHAL, 1971).

Die Bedeutung des Steroid-Proteinkomplexes für den Progesteronstoffwechsel konnten BILLIAR et al. (1969) anhand von Versuchen aufzeigen, bei denen im " in-vitro-Ansatz ", Progesteron, bei Anwesenheit von Human-CBG und Human-Serum-Albumin, von 2oα - Hydroxysteroid-Dehydrogenase enzymatisch nicht angegriffen werden konnte.

Bei Versuchen am ligierten Mäuseuterus (WESTPHAL und FORBES, 1963; HOFFMANN et al., 1969) konnte der Einfluß der Proteinbindung auf die biologische Wirkung von Progesteron gezeigt werden. Ein histologisch nachweisbarer Effekt am Uterus durch Verabreichung von Progesteron

trat nämlich nicht mehr in Erscheinung, wenn Progesteron und Protein gleichzeitig verabreicht wurden.
Bei den " in vivo "-Verhältnissen ist jedoch zu berücksichtigen, daß zwischen Progesteron und seinem Bindungsprotein ein dynamisches Gleichgewicht besteht (siehe Kap. 3.3.2.1.), d.h. ein bestimmter Prozentsatz des Progesterons liegt immer in ungebundener, also biologisch aktiver Form vor.
Durch die Bindung des Steroids an das Protein kommt es also einmal zu einer Verminderung der chemischen Aktivität des Steroidhormones, gleichzeitig wird aber das Steroidhormon seinerseits im Organismus vor chemischen und besonders vor enzymatischen Abbauvorgängen in der Leber geschützt. Auch die Adsorption an Blutgefäßwände und andere Oberflächenstrukturen wird durch die Bindung an Proteine verhindert. Gleichzeitig stellt der Steroid-Protein-Komplex aber auch eine " ungefährliche " Form eines Reservoirs dar, in dem auch verhältnismäßig große Hormonengen aufbewahrt werden können, ohne biologische Wirkungen zu entfalten (WESTPHAL, 1971).

WESTPHAL 1971 vermutet weiterhin, daß an entsprechenden Erfolgsorganen eine Konkurrenzsituation zwischen dem Rezeptor-Protein mit einer hohen Bindungsaffinität und dem Plasmaprotein mit niederiger Bindungsaffinität besteht. Eine ähnliche, aber umgekehrte Situation könnte am Steroidhormon-produzierenden Organ vorliegen.

Die Inaktivierung und der Abbau von Progesteron finden hauptsächlich in der Leber statt und wird im wesentlichen durch Reduktion der C-3 und C-2o Ketogruppen, bzw. Hydrierung des A-Ringes erreicht (HAYANO et al., 1956). Die Ausscheidung der Abbauprodukte erfolgt zum größten Teil über die Niere, bei der Frau in der Regel als Pregnandiol-glucuronid (ein Glucuronsäureester); Pregnandiol kann aber auch in freier Form in den Faeces gefunden werden (KLOPPER, 1956).
Im Rinderharn wurde von HARASZTI et al. (1968) 5ß-Pregnan-3α , 2oα - diol als Hauptprodukt des Progesteronstoffwechsels isoliert und eine Abhängigkeit der Ausscheidungsmengen vom Zyklusstadium beobachtet.
(2,o ng/24 Std. im Östrus ; 6,8 ng am 7. bzw. 8 Zyklustag).

2.2. Progesteronproduzierende Organe

Die Produktion von Progesteron im weiblichen Organismus erfolgt in ganz bestimmten Organen und Geweben. In erster Linie ist dabei das Ovar zu nennen und hier insbesondere das Corpus luteum. Ein weiteres wichtiges Produktionsorgan für Progesteron ist die Plazenta. Die Funktion beider endokrinen Organe, Corpus luteum und Plazenta, ist jedoch vom Fortpflanzungsgeschehen abhängig. Auch die Nebenniere ist in der Reihe progesteronproduzierender Organe anzuführen.

2.2.1. Corpus luteum

Die Progesteronproduktion erfolgt während des Zyklus beinahe ausschließlich im Corpus luteum periodicum, das dieses Hormon speziesbedingt über einen bestimmten Zeitraum und in bestimmten Mengen synthetisiert und in den Blutkreislauf abgibt.
So liegt bei allen Spezies die spezielle Bedeutung des während des Zyklus im Corpus luteum produzierten Progesterons darin, ein uterines Milieu vorzubereiten, in dem nach stattgehabter Befruchtung die Nidation und das Weiterleben der Frucht im Uterus gewährleistet ist. Dies zeigt sich histologisch und morphologisch in der Umstellung der Uterusschleimhaut von der Proliferationsphase - in der es hauptsächlich unter Einwirkung der Östrogene zu einem Wachstum der Uterindrüsen kommt - in die Sekretionsphase, in der die Differenzierungsvorgänge im Endometrium überwiegen. Diese Umstellung geschieht beispielsweise beim Rind ca. am 5. Tag des Zyklus (KOLB, 1967).

Hat eine Konzeption stattgefunden, so verwandelt sich das Corpus luteum periodicum in das Corpus luteum graviditatis, das bei der Ratte (JOHNSON und CHALLANS, 193o) Kaninchen (FRAENKEL und COHN,19o2) der Ziege (MEITES et al., 1951; HEAP und LINZELL, 1965) und dem Schwein (DU MESNIL DU BUISSON

und DAUZIER, 1957, SPIES et al., 196o, SHORT, 196o) die wichtigste Progesteronquelle während der Gravidität darstellt. Auch beim Rind ist das Corpus luteum graviditatis wohl die hauptsächliche Progesteronquelle während der Trächtigkeit (STABENFELDT et al., 197o), obwohl die Entfernung des Corpus luteum zu verschiedenen Zeitpunkten im letzten Drittel der Gravidität widersprüchliche Ergebnisse brachte (ESTERGREEN et al., 1967).

Beim Schaf produziert das Corpus luteum graviditatis zwar auch noch nach dem 6o. Trächtigkeitstag Progesteron (EDGAR und RONALDSON, 1958; LINDNER et al., 1964), für die Aufrechterhaltung der Gravidität ist die Gelbkörperfunktion jedoch nur in der Zeit vor dem 55. Trächtigkeitstag entscheidend (NEHER und ZARROW, 1954; DENAMUR und MARTINET, 1955; LINDNER et al., 1964; DEANE et al., 1966; LINZELL und HEAP, 1968).

Ähnlich sind die Beobachtungen bei der Frau, wo das Corpus luteum nur bis zum 4o.Graviditätstag die Hauptprogesteronquelle darstellt. (VENNING, 1957; ASDELL, 1964).

Hinsichtlich der Progesteronproduktion seitens des Corpus luteum graviditatis nimmt die Stute eine Sonderstellung ein. Während das eigentliche Corpus luteum graviditatis etwa am 35. Tag der Trächtigkeit degeneriert, bilden sich aus den Ovarien schubartig Follikel nach, die zu Corpera lutea auxiliaria umgewandelt werden (AMOROSO, 1948) und dann bis zum Beginn ihrer Degeneration, nach dem 15o. Trächtigkeitstag, eine ergiebige Progesteronquelle darstellen (COLE und SAUNDERS, 1935; COLE und GOSS, 1943; CLEGG et al., 1954; JÖCHLE, 1957).

2.2.2. Plazenta

Unter den endokrinen Organen hat die Plazenta eine Sonderstellung, da sie nur während der Gravidität vorhanden ist. Zu den speziesabhängigen endokrinen Syntheseleistungen der Plazenta gehört neben der Produktion

von Östrogenen und bestimmten glandotropen Hormonen auch die Produktion von Progesteron. Progesteron konnte bisher aus Plazentagewebe der Frau (DICZFALUSY, 1952; PEARLMAN und CERCEO, 1952), des Schafes (SHORT und MOORE, 1959) und der Stute (SHORT, 1957) isoliert werden.
Dabei wurde gezeigt, daß die Plazenta der Primaten nach dem 4o. Graviditätstag die wesentliche Progesteronquelle darstellt (VENNING, 1957; HUTCHINSON et al., 1962; ASDELL, 1964).

Wie schon in Kap. 2.3.1. erwähnt, degenerieren bei der Stute am 15o. Trächtigkeitstag die Corpera lutea auxiliaria. Danach übernimmt die fötale Plazenta (SHORT, 196o) die Progesteronproduktion. Hierbei ist bemerkenswert, daß dieses plazentär synthetisierte Progesteron, das bis zur Geburt in der Plazenta nachweisbar ist, bisher nicht im peripheren Blut analysiert werden konnte (SHORT, 1957).

Beim Schaf schließlich, geht die hauptsächliche Progesteronproduktion am 55. Trächtigkeitstag vom Corpus luteum auf die Plazenta über und bleibt dort bis zum Ende der Gravidität bestehen. (DENAMUR und MARTINET, 1955; SHORT und MOORE, 1959; LINDNER et al., 1964).

Ob die Plazenta der Kuh eine Funktion als Progesteronproduktionsstätte ist, scheint noch nicht sicher geklärt zu sein. Während SHORT (1956), GORSKI et al., (1958) und GOMES und ERB (1965) in Rinderplazenten kein Progesteron nachweisen konnten, isolierten MELAMPY et al. (1959) größere Mengen (2oo µg/kg Rinderplazenta) einer Verbindung, die sie für Progesteron hielten. BOWERMAN und MELAMPY (1962) konnten diesen Befund jedoch nicht bestätigen, da sie in ihren Untersuchungen lediglich in einer von fünf Plazenten Progesteron in einer Menge von 4,4 µg/kg Gewebe nachwiesen. Zur Klärung dieser Frage scheinen weitere Untersuchungen mit verfeinerten und spezifischen Methoden notwendig.

Eine Zusammenfassung der funktionellen Bedeutung von Progesteron während der Trächtigkeit landwirtschaftlicher Nutztiere wird von MÄRZ (1971) gegeben.

2.2.3. Nebennierenrinde (NNR)

Die Hauptfunktion der Nebennierenrinde liegt in der Synthese und Sekretion von Mineralo-und Glucocorticoiden. Eine unvermeidbare Zwischen- ja sogar Ausgangsstufe bei der Produktion dieser Hormone ist Progesteron (KARLSON, 197o). So konnte Progesteron aus der Nebenniere vom Rind (BALFOUR et al., 1957; GORSKI et al., 1958; SHORT, 1960; STORMSHAK und ERB, 1961) Schaf (BALFOUR et al., 1957; SHORT und MOORE, 1959) Schwein (BALFOUR et al., 1957) und Mensch (ZANDER, 1960)isoliert werden.

Über eine erhöhte Progesteronkonzentration im Kreislauf beim Hitzestress berichtet STOTT und ROBINSON (197o) bei Untersuchungen am Rind.

2.3. Regulation der Progesteronbiosynthese

2.3.1. Allgemeines Prinzip

Die hormonale Regulation des Fortpflanzungsgeschehens wurde bereits in den frühen zwanziger Jahren dieses Jahrhunderts von ALLEN und DOISY erkannt, die in ihren klassischen Versuchen feststellten, daß der " Liquor follikuli" großer Follikel des Schweineovars, ebenso wie fettlösliche Extrakte aus dieser Flüssigkeit, eine Substanz enthält, die in der Scheide der kastrierten Maus brunstähnliche Veränderungen hervorrufen " (zitiert nach TURNER, 1966). ASCHHEIM und ZONDEK entdeckten 1927 im Harn gravider Frauen 2 Hormone, von denen das eine " in der Scheide der kastrierten Maus dieselben Wirkungen zeigte, wie die Flüssigkeit des Graaf'schen Follikels, während das andere ein deutliches Wachstum des Follikels verursachte". Diese Hormone wurden später als Östrogene und Humanes Choriongonadotropin (HCG) identifiziert. Die östrogenen Substanzen wurden erstmals von

DOISY (1929) und BUTENANDT (1929) nach Extraktion von Harn schwangerer Frauen in kristalliner Form dargestellt. Das heute unter der Bezeichnung " Human Chorionic Gonadotropin (HCG) bekannte Gonadotropin wurde ursprünglich von ASCHHEIM und ZONDEK als " Prolan " bezeichnet, wobei sein Ursprung in der Hypophyse vermutet wurde. KIDO (1937) konnte jedoch durch Transplantation menschlicher Plazentastücke in die Augenvorderkammer des Kaninchens den klaren Beweis für die plazentäre Herkunft von " Prolan " (=HCG) erbringen. Einflüsse des zentralen Nervensystems (Hypophyse) auf die Sexualfunktionen konnten schon von SMITH und ENGLE (1927) festgestellt werden. Im Jahre 1932 geben MOORE und PRICE eine zusammenfassende Obersicht über die damals bekannten Steuerungsmechanismen der Sexualfunktionen, wobei erstmals auch die " reziproke " Wirkung des Sexualhormonspiegels auf die Regulation der Gonadotropinausschüttung des Hypophysenvorderlappens (HVL) und somit die Zusammenhänge des neurohormonalen Steuerungsmechanismus der Sexualfunktionen beschrieben werden. Ein der Hypophyse übergeordneter Regulationsmechanismus im zentralen Nervensystem wurde von HOHLWEG und JUNKMANN (1932), sowie später von HINSEY (1937) vermutet, konnte jedoch erst 1952 von HARRIS und JACOBSOHN ausführlicher beschrieben werden, wobei sie zeigten, daß Hypophysen, die an die Eminentia mediana transplantiert wurden und damit Anschluß an das " Portalgefäßsystem " hatten, wieder funktionsfähig waren, während nach Hypophysentransplantationen unter den Lobus temporalis, wobei eine Verbindung mit dem corticalen Gefäßsystem und dem Gefäßsystem der Dura hergestellt wurde, Anöstrie und Unterentwicklung der Genitalorgane auftraten. Bezogen auf die am Fortpflanzungsgeschehen beteiligten endokrinen Drüsen ergeben sich aufgrund dieser Untersuchungen enge funktionelle Beziehungen zwischen Hypothalamus, Hypophysenvorderlappen (HVL) und den Gonaden. Die Bedeutung des Hypothalamus für die hormonellen Regulationsmechanismen wurde aber erst in den vergangenen 1o Jahren erkannt und näher beschrieben, insbesondere nachdem es gelang, die dort freigesetzten " Releaser-Faktoren " (siehe unten) nachzuweisen (HANSEL, 1961 ; NALBANDOV, 1963 ; MCCANN und PORTER, 1969). Zur Funktion des Hypothalamus schreibt KARG (197o) daß dieser das Regelzentrum ist, in-

dem sowohl exogene (Tageslichtlänge, Fütterung, Deckpartner u.a. Umweltfaktoren), als auch endogene (z.B. Blutspiegel der Sexualhormone) Informationen empfangen, entschlüsselt und in Aktionen umgesetzt werden. Als Aktionssubstanzen stehen sog. " Releaser-Faktoren " (RF) zur Verfügung, die in spezifischer Weise in der nachgeordneten Drüse, nämlich der Hypophyse, die Hormonfreisetzung (mit Ausnahme von Prolaktin) bewirken. Diese " Releaser-Faktoren " (RF) gelangen über den hypophysären Portalkreislauf (POPA und FIELDING, 193o; HOUSSAY et al., 1935; WISLOCKI und KING 1936) aus dem Hypothalamus in den HVL. Für die Sexualfunktion sind insbesondere die beiden im HVL gebildeten Gonadotropine LH (Luteinisierungs-Hormon) und FSH (Follikelstimuluriendes Hormon) verantwortlich, deren " Releaser-Faktoren " (LH-RF, FSH-RF) erstmals von McCANN et al.(196o) bzw. von IGARASHI und McCANN (1964) nachgewiesen wurden. Bei den von SCHALLY et al. (1971) isolierten LH- und FSH-Releaser-Faktoren des Schweines, handelt es sich chemisch gesehen, um ein Dekapeptid. Inzwischen konnte diese Substanz auch synthetisch dargestellt werden (BABA et al., 1971). Auch für weitere HVL-Hormone, wie ACTH, TSH und STH konnten Releaser-Faktoren nachgewiesen (McCANN und PORTER, 1969) und teilweise chemisch identifiziert werden (BOWERS et al., 197o).

Die Sekretion von Prolaktin, das man nur bei der Ratte und Maus, aufgrund seiner nachgewiesenen luteotropen Wirkung, als Gonadotropin bezeichnen kann (siehe Kap. 2.3.2.2.), wird - im Gegensatz zu den bereits erwähnten Gonadotropinen LH und FSH nach Versuchen an der Ratte vornehmlich durch einen spezifischen hypothalamischen Hemmfaktor (PIF = prolactin inhibiting factor) gesteuert (TALWALKER et al., 1963).

Die Kontrolle der Prolaktinfreisetzung duch einen derartigen Hemmfaktor konnte inzwischen mehrfach bestätigt werden (EVERETT, 1964; McCANN et al., 1968; DHARIWAL et al.,1968).

Während die gonadotrope Wirkung von FSH im weiblichen Organismus

im Wesentlichen in einer Stimulierung des Follikelwachstums gesehen wird, werden für LH differenziert diskutiert (KARG und SCHAMS, 197o a):

1. Auslösung der Ovulation
2. Die Luteinisierung, d.h. die Bildung des Corpus luteum, wodurch gleichzeitig die wichtigste Progesteronquelle geschaffen wird
   (siehe Kap. 2.2.1.)
3. Der luteotrope Effekt, d.h. die Erhaltung der Funktionen des Corpus luteum und damit Aufrechterhaltung der Progesteronsekretion.

Unter dem Einfluß der Gonadotropine kommt es also im weiblichen Organismus, neben einer allgemeinen Stimulierung der Keimdrüsen, insbesondere zur Produktion der Sexogene , also von Östrogenen und von Progesteron, die dann an den entsprechenden Erfolgsorganen (z.B. Cervix, Uterus, Eileiter), ihre Wirkungen entfalten (KOLB, 1967).

Für die Sexogene ist dabei von Bedeutung, daß ihr Anstieg im peripheren Blutkreislauf vom Hypothalamus registriert wird, d.h. auf der Grundlage eines sog. Rückkopplungsmechanismus (negatives feedback) wird die Freisetzung der Gonadotropine dann indirekt blockiert. Durch diesen negativen Feed-back-Mechanismus wird also zwischen dem Hypothalamus-HVL-System und den Gonaden ein Gleichgewichtszustand hergestellt (KARG, 1968). So wird z.B. durch einen erhöhten Östrogenblutspiegel, der physiologischerweise während der Brunst auftritt, in erster Linie die Bildung und Sekretion von FSH, zum Teil auch von LH, blockiert (LISK, 196o;), während ein erhöhter Progesteronblut-

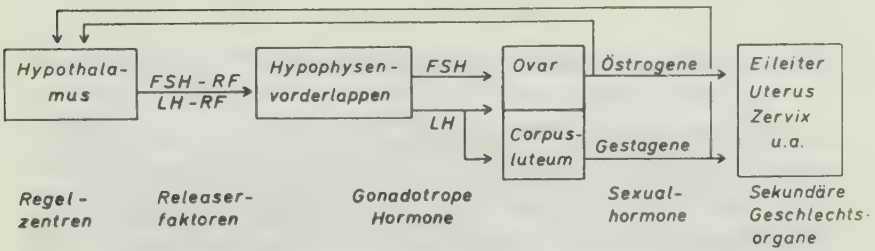
spiegel im wesentlichen nur die Freisetzung von LH hemmt (DÖCKE et al., 1968).

Neben den hypophysären Gonadotropinen, kennen wir auch solche, die in der Plazenta gebildet werden. Dazu gehört das bereits 1927 von ASCHHEIM und ZONDEK im Harn schwangerer Frauen gefundene HCG, ein Hormon, das ähnliche biologische Wirkungen wie LH besitzt (BRINK-JOHNSEN und BENIRSCHKE, 1968). Daneben gelang es COLE (1938) im Serum gravider Stuten, das " Pregnant Mare Serum Gonadotrophin " (PMSG) nachzuweisen, ebenfalls ein gonadotropes Hormon mit FSH und LH ähnlichen Eigenschaften. Auf diese beiden Gonadotropine soll jedoch erst im Kap. 2.3.2. näher eingegangen werden.

Zusammenfassend können, am Beispiel des Sexualzyklus, die hormonalen Steuerungsvorgänge nach einer Darstellung von KARG (197o) in Abb. 3 wiedergegeben werden. Hieraus kann abgeleitet werden, daß beispielsweise bei Abfall des Gestagen-(Progesteron)-Blutspiegels, dieses Defizit im Hypothalamus registriert wird und somit durch den negativen feed-back eine erhöhte Ausschüttung von LH erfolgen muß, wodurch das zyklische Geschehen von neuem in Gang gesetzt wird.

Abb. 3

Regelkreis des Sexualzyklus



(nach einer Veröffentlichung von KARG, 197o)

2.3.2. Bisher bekannte und experimentell nachgewiesene Regulationsmechanismen.

Wie schon im vorhergehenden Kapitel aufgeführt, ist die Sekretion der Sexogene einem ganz bestimmten Regulationsmechanismus unterworfen. Für die Aufrechterhaltung des aus den Thekainterna-Zellen nach Ruptur des Follikels entstandenen Gelbkörpers und der damit verbundenen Progesteronausschüttung, wurde von ASTWOOD (1941) und CUTULY (1942) nach Untersuchungen an hypophysektomierten Ratten erstmals ein Hypophysenhormon, das als luteotropes Hormon (LTH) bzw. Prolaktin bezeichnet wurde, verantwortlich gemacht.

Entgegen ursprünglichen und weitverbreiteten Annahmen, konnte inzwischen jedoch gezeigt werden, daß bei den Spezies Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, Katze, Schaf, Schwein, Rind und Frau, LTH nicht in der Lage ist, die Lebensdauer des Gelbkörpers zu verlängern. Die hauptsächliche luteotrope Wirkung fällt bei diesen Spezies dem Hypophysenhormon LH zu (NALBANDOV, 197o).

In den nächsten Kapiteln soll auf die bisher bekannten Regulationsmechanismen zur Steuerung des Gelbkörpers, unter besonderer Berücksichtigung seiner speziellen Funktion als Progesteronquelle eingegangen werden.

2.3.2.1. Stellung der Gonadotropine

Entsprechend ihrem Namen, sind Gonadotropine Substanzen, die wesentlichen Einfluß auf die Funktion der Gonaden ausüben. Bei den in den basophilen Zellen des HVL gebildeten Gonadotropinen LH (Luteinisierungshormon oder ICSH = Interstitial Cell Stimulating Hormon) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon), handelt es sich um Gly-

koproteide mit einem Molekulargewicht von ca. 28 ooo (TURNER, 1966).

Im Harn von Frauen in der Menopause, wie auch im Harn vom kastrierten Mann, konnte das sog. human menopausal gonadotropin (HMG) nachgewiesen werden (FLUHMAN, 1929; HAMBURGER, 1931). Es handelt sich ebenfalls um ein Gonadotropin hypophysären Ursprungs mit einer vornehmlich FSH ähnlichen Wirkungsweise, gleichzeitig ist aber auch eine geringfügige LH ähnliche Wirkung nachzuweisen (VOSS, 196o; SEGALOFF, 1962; TAUSK, 197o).

Neben den hypophysären Gonadotropinen kennt man aber auch solche, die plazentären Ursprungs sind und bisher bei Primaten und Stuten nachgewiesen werden konnten (HISAW und ASTWOOD, 1942). Bei der Frau handelt es sich dabei um HCG (Human chorionic gonadotropin), das aus dem Schwangerenharn gewonnen wird; bei der Stute kann das PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) isoliert werden. Das HCG ist ein Glykoproteid mit einem Molekulargewicht von ca. 3o ooo und besitzt eine LH ähnliche Wirkung (TURNER, 1966). PMSG hat FSH und LH ähnliche Wirkungen, wird in den sog. endometrial cups (Endometriumkratern) des Allantochorions bei der trächtigen Stute produziert und kann zwischen dem ca. 3o. - 13o. Trächtigkeitstag aus dem Serum isoliert werden, wobei zwischen dem 6o. - 7o. Tag Höchstwerte erreicht werden (COLE, 1938; ALLEN, 1969). Die Plazenta der Ratte soll ein Hormon produzieren, das für die Aufrechterhaltung der Corpora lutea während der Gravidität bei dieser Spezies verantwortlich sein soll (NALBANDOV, 1964).

Die biologische Wirkung der Gonadotropine im Organismus konnte jedoch erst in den letzten Jahren klarer umrissen werden, nachdem hochgereinigte Gonadotropinpräparationen erhältlich waren und durch Einführung radioimmunologischer Meßverfahren spezifische und empfindliche Messungen der endogenen Hormone möglich wurden. Für die speziellen Vorgänge am Ovar darf als gesichert gelten, daß die Auslösung der Ovulation

unbedingt vom Gonadotropin LH abhängig ist. Die Luteinisierung des geborsteten Follikels wird ebenfalls unter dem Einfluß dieses Hormons gesehen, was auch zur ursprünglichen Bezeichnung Luteinisierungshormon veranlasste (KARG und SCHAMS, 197o a). Aufgrund von Untersuchungen am Kaninchen kommen aber EL-FOULY und COOK (1969) und EL-FOULY et al. (197o) zumindest bei dieser Spezies zu der Schlußfolgerung,daß allein der mechanische Vorgang der Entfernung des Ovums aus dem Follikel genügt, um die Luteinisierung einzuleiten. So konnten sie zeigen, daß die Granulosaschicht unmittelbar luteinisiert und histologisch eine vom Gelbkörpergewebe nicht unterscheidbare Struktur annimmt, wenn das Ovum aus dem reifen Follikel entfernt wird (" Ovektomie "). Nach der Ovektomie produziert das entstandene Gelbkörpergewebe Progesteron, 2oα- OH-Progesteron und ein bisher unbekanntes Steroid, das im normalen Gelbkörper nicht gefunden werden kann. Im Gegensatz zur LH induzierten Ovulation, der eine Pseudogravidität von 16-21 Tag folgt, wird die luteinisierte Granulosaschicht aber, ohne ein Corpus luteum gebildet zu haben, bereits bis zum 8. Tag nach der Ovektomie vollständig zurückgebildet.

Aus diesen Beobachtungen beim Kaninchen schließt NALBADOV (197o) erstens," daß ein einzelner Follikel in einem Ovar vollständig autonom ist und in Anwesenheit von reifen Follikeln luteinisieren kann, ohne daß dadurch benachbarte Follikel beeinträchtigt werden. Zweitens, daß das Ovum eine luteostatische Substanz produziert, die wahrscheinlich in der Follikelflüssigkeit vorhanden ist und die Luteinisierung der Granulosazellschicht so lange verhindert, wie das Ei im Follikel verbleibt". Da parallel zu den beschriebenen Versuchen aber von keinen LH-Messungen berichtet wird, kann der Einfluß von endogenen LH nicht ausgeschlossen werden.

Grundlegende Erkenntnisse über die Stellung der Gonadotropine wurden zunächst anhand der nach der Entfernung der Hypophyse (Hypophysektomie) auftretenden Ausfallserscheinungen gewonnen. Da die Hypophyse aber neben den gonadotropen Hormonen auch andere trope Hormone syn-

thetisiert und ausschüttet, hat die Hypophysektomie für den Organismus einschneidende Folgen, die - bezogen auf die Wirkung der Gonadotropine - bei der Interpretation der Ergebnisse solcher Eingriffe berücksichtigt werden müssen (TURNER, 1966).

Aufgrund chirurgischer Schwierigkeiten konnte eine totale Hypophysektomie bisher nicht bei Rind und Pferd durchgeführt werden, während die Durchführung dieses Eingriffs bei den kleinen Nagetieren keine Schwierigkeiten bereitet. An hypophysektomierten Ratten konnten UCHIDA et al. (1969) das Ausbleiben des präovulatorischen Progesteronanstieges beobachten. Durch Verabreichung von Hypophysenextrakt (von Ratten) oder LH, HCG bzw. PMSG, konnte bei diesen Tieren die Progesteronsekretion wieder stimuliert werden, wobei LH den deutlichsten Effekt zeigte. Der Progesteronanstieg konnte auch mit FSH, TSH (Thyreoidea stimulierendes Hormon) oder STH (Somatropes Hormon = Wachstumshormon) in höheren Dosen herbeigeführt werden. Bei letzteren wird jedoch vermutet, daß die Präparationen mit LH kontaminiert waren, da sich ja bereits geringe Dosen davon als effektiv erwiesen.

MOUGDAL (1969) konnte am Beispiel trächtiger Ratten, die am 8. Tag der Gravidität hypophysektomiert wurden und anschließend bis zum 12. Tag täglich LH subkutan verabreicht bekamen, zeigen, daß durch diese Behandlung noch am 13. Tag Foeten im Uterus waren, während unbehandelte Kontrolltiere ihre Foeten im Uterus resorbiert hatten.

Werden trächtige Kaninchen in der 2. Woche der Gravidität hypophysektomiert, so degenerieren die Corpora lutea rasch, es kommt zum Abbruch der Gravidität und vorhandene Follikel zeigen in kurzer Zeit deutliche Involutionserscheinungen. (SPIES et al., 1968). Durch intravenöse Injektionen von HCG konnte bei hypophysektomierten Kaninchen die Ovulation ausgelöst werden, dabei verringerte sich aber die Wirkung dieser Behandlung innerhalb der folgenden 12

Stunden in zunehmendem Maße (BETTERIDGE, 1971 a). Auf weitere Möglichkeiten die Folgen der Hypophysektomie beim Kaninchen durch exogene Hormonzufuhr auszugleichen, soll weiter unten und im speziellen erst im nächsten Kapitel (2.3.2.2.) eingegangen werden. Bei Schweinen, die kurz vor (innerhalb 4 Stunden nach Beginn der Rausche) oder zu verschiedenen Zeiten nach der Ovulation (2 - 1o Tage) hypophysektomiert wurden, fanden DU MESNIL DU BUISSON et al. (1963, 1964) eine weniger stark ausgeprägte Abhängigkeit von der Hypophyse, d.h. von den Gonadotropinen. Bei Hypophysektomie vor der Ovulation glichen das Gewicht und die Progesteronkonzentrationen der Gelbkörper am 6. und 9. Tag nach dem Eingriff nicht hypophysektomierten Kontrolltieren, erst am 13. Tag wurden vergleichsweise niederigere Werte, insbesondere der Progesteronkonzentrationen gefunden. Hypophysektomie in der Lutealphase (siehe oben), ergab bei gleichen Untersuchungen normale Werte bis zum 7. und 8. Tag, hingegen waren auch hier am 13. und 14. Tag die Ergebnisse niederiger als bei Kontrolltieren. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von ANDERSON et al. (1967) an hypophysektomierten Schweinen, bzw. an Schweinen denen der Hypophysenstiel durchtrennt worden war. Durch Verabreichung von Hypophysenextrakten (25 mg/Tag) ab dem 12. Tag, konnte aber die volle Progesteronsekretion bis zum 2o. Zyklustag erhalten werden (DENAMUR, 1968). Wurden Schweine am 2. Zyklustag hypophysektomiert, so konnte durch tägliche Gaben von 5 mg LH oder 1ooo I.E. HCG dasselbe Ergebnis nur erreicht werden, wenn die Tiere am 12. Tag noch hysterektomiert wurden (ANDERSON et al.,1965) (siehe auch Kapitel 2.3.2.3.).

Im Gegensatz zum Schwein konnte bei der Spezies Schaf eine starke Abhängigkeit des Aufbaues und der Erhaltung der Corpora lutea von luteotropen Substanzen festgestellt werden. Hypophysektomiert man zyklische oder gravide Schafe, so erfolgt eine schnelle und vollständige Degeneration der Gelbkörper (KALTENBACH et al., 1968).

In diesen Versuchen erwiesen sich ungereinigte Hypophysenextrakte oder ungereinigtes LH bei Dauerinfusion als luteotrop, während hochgereinigtes LH nur begrenzt luteotrop wirkte. Die separate Verabreichung von FSH, Prolaktin oder Östrogenen, ergab dagegen keine luteotrope Wirkung (KALTENBACH et al., 1968).

Bei hypophysektomierten Frauen mit funktionsfähigen Ovarien kann, nach Induktion des Follikelwachstums durch hypophysäres FSH, nach Verabreichung von HCG, Ovulation mit anschließender Corpus luteum Bildung ausgelöst werden (BETTENDORF, 1963; BETTENDORF et al., 1964; GEMZELL und KJESLLER, 1964). Aufgrund solcher Untersuchungen wird angenommen, daß HCG bei der Frau luteotrope Wirkung besitzt.

Die Bedeutung von LH für die Progesteronbiosynthese kann auch durch die Ausschaltung endogenen LH's mit spezifischem LH-Anti-Serum nachgewiesen werden, was auch die Grundlage für die eigenen am Rind durchgeführten Versuche bildete (siehe Kap. 4). In Untersuchungen an trächtigen Ratten konnten MOUGDAL et al., (1969) und LOEWIT et al., (1969 a/b) zeigen, daß die Foeten nach Behandlung der Muttertiere mit LH-Antiserum resorbiert wurden. Die Autoren schlossen aus diesen Befunden, daß die Funktion des Corpus luteum auch während der Gravidität von endogenem LH abhängig ist. Gleichzeitig konnten sie bei diesen Versuchen demonstrieren, daß die Gravidität durch Progesteronsubstitution aufrechterhalten werden kann. Einen Abfall der Progesteronsekretion in die Ovarvene konnten YOSHINAGA et al. (1971) nach Anti-LH-Serum-Verabreichung an laktierende Ratten beobachten. Beim hypophysektomierten Kaninchen konnte die schon weiter oben beschriebene Auslösung der Ovulation durch HCG mit einem Anti-Serum gegen Schweine-LH geblockt werden. Dieses Anti-Serum verhindert auch die physiologischerweise, beim intakten Kaninchen durch den Koitus spontan induzierte Ovulation, wenn es unmittelbar post coitem verabreicht wurde; 9o Minuten nach

der Kopulation verabreicht, zeigte es kaum noch Wirkung (BETTERIDGE, 1971 b). Ober die Degeneration der Corpora lutea und den vollständigen Verlust der Früchte gravider Jungsauen durch Injektion von ungereinigtem bovinem Anti-LH-Serum (gewonnen bei Kaninchen) wird von SPIES et al. (1967) berichtet. Bei gleichzeitiger Applikation von Progesteron konnte jedoch die Trächtigkeit aufrechterhalten werden. Wurde das Antiserum aber in der Lutealphase des Zyklus verabreicht, hatte es kaum Wirkungen auf die Progesteronkonzentrationen und das Gewicht des Gelbkörpers. Zu Beginn der Rausche verhinderte aber das Anti-Serum bei 2 von 4 Jungsauen die Ovulation.

FULLER und HANSEL (197o) behandelten Schafe zwischen dem 2. - 8. Zyklustag täglich subkutan mit bovinem Anti-LH-Serum (gewonnen vom Pferd) und stellten danach bei dem am 9. Zyklustag entfernten Gelbkörper einen Gewichtsverlust und eine Abnahme der Progesteronkonzentrationen fest. Im Anschluß an diese Versuche zeigten die Kontrolltiere schon nach ca. 2 Tagen wieder Brunsterscheinungen, während diese bei den behandelten Tieren erst nach 28- 29 Tagen auftraten. Bei trächtigen Schweinen konnten SAMMELWITZ et al,(1961) durch Progesterononinjektionen vom Tage der Ovulation bis zum 3o. Trächtigkeitstag die Bildung der Gelbkörper nicht verhindern, während Progesteron vom 12. - 16. Trächtigkeitstag, also nach der Gelbkörperbildung, eine rasche und vollständige Rückbildung der Corpora lutea verursachte. Darauf aufbauend versuchten BRINKLEY et al . (1964 a/b) die Produktion endogener Gonadotropine zu blockieren, um damit die Gelbkörperbildung und Funktionen zu beeinflussen. Sie konnten bei diesen Versuchen aber zeigen, daß trotz täglicher subkutaner Progesteroninjektionen, auch wenn damit bereits einen Tag vor der Ovulation begonnen wurde, die Bildung und Erhaltung der Corpora lutea bis zum 14. Tag nach der Ovulation gewährleistet war. Bei ähnlicher Versuchsdurchführung konnten am 1o. Zyklustag fast normale Progesteronkonzentrationen im Gelbkörpergewebe gefunden werden, der absolute Progesterongehalt war dagegen deutlich niedriger (BRINKLEY et al. (1964 a). Eine Blockade hypophysärer Gonadotropine konnte

auch durch kontinuierliche Verfütterung eines Gestagenpräparates (6α - methyl - 17α - hydroxyprogesteronazetat, 5oo mg/ Tag) an Jungsauen erreicht werden, wodurch zunächst Stillstand der Ovarfunktion bewirkt wurde. Unter diesen Bedingungen konnte die Follikelbildung durch PMSG induziert und die Ovulation durch eine anschließende HCG-Injektion ausgelöst werden. Trotz der fortgesetzten Verfütterung des erwähnten Gestagenpräparates wurden am 9. Tag nach der HCG-Injektion normale (in Struktur und Progesterongehalt) Gelbkörper gefunden. Bei trächtigen Jungsauen mit demselben " Hypophysenblock " konnten tägliche HCG-Gaben (vom 25. Tag der Gravidität beginnend, 1o oder 16 Tage lang) zwar die Gelbkörper, aber nicht die Progesteronkonzentrationen erhalten. Dagegen degenerierten die Gelbkörper bei Kontrolltieren, die nur mit dem oben genannten Präparat behandelt wurden (BRINKLEY et al., 1964 b).

Aus den bisher bekannten Ergebnissen beim Schwein leitet NALBANDOV (197o) ab, " daß sich die Bildung des zyklischen Corpus luteum beim Schwein, sobald die Ovulation stattgefunden hat, unabhängig von hypophysärer Unterstützung vollzieht und keine weitere hypophysäre Stimulierung notwendig ist. Bei trächtigen Schweinen wird jedoch der zyklische Gelbkörper zum Corpus luteum graviditatis, das fortwährende hypophysäre Unterstützung für seinen Fortbestand benötigt ".

Zusätzliche Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der Progesteronbiosynthese wurden aus Beobachtungen exogen zugeführter gonadotroper Hormone erhalten. So berichten YOSHINAGA et al. (1971) von der Steigerung der Progesteronsekretion in die Ovarvene nach Verabreichung von LH an laktierende Ratten; im gleichen Versuch wurden, wie schon oben erwähnt, durch Gabe von Anti-LH-Serum ein Abfall der Progesteronsekretion herbeigeführt. Auch BARRACLOUGH et al.(1971) konnten mit LH die Progesteronausschüttung bei der Ratte steigern, FSH oder Prolaktin zeigten indes keine luteotrope Wirkung. Beim Kaninchen dagegen können durch LH-Injektioen (225 µg/Tag) oder

LH und Prolaktin Kombinationen, Aborte und Rückbildung der Gelbkörper, die durch Röntgenbestrahlung der Ovarien verursacht wurden, nicht verhindert werden (KEYES und ARMSTRONG, 1968).

Die Sonderstellung des Kaninchens bezüglich der Steuerung der Progesteronsynthese konnte auch durch selektive Zerstörung der Follikel mit Röntgenstrahlen gezeigt werden; dadurch wurde die Hauptproduktionsstätte der Östrogene, denen ja bei Kaninchen eine besondere luteotrope Stellung zukommt (NALBANDOV, 197o) ausgeschaltet. Nach einer solchen Behandlung abortierten Kaninchen (KEYES und NALBANDOV, 1967). Die spezifische luteotrope Wirkung von Östrogenen beim Kaninchen konnte bereits 1951 von HAMMOND und ROBSON nachgewiesen werden, die durch Implantation eines Östrogenkristalles in ein Corpus luteum dieses funktionsfähig erhalten konnten, während sich benachbarte Gelbkörper zurückbildeten.Dennoch konnten EATON und HILLIARD (1971) bei dieser Spezies eine Stimulation der Progesteron - und 2oα - OH-Progesteron, insbesondere jedoch der 17ß-Östradiolsekretion durch eine einmalige Verabreichung von o,5 oder 2,o µg LH/kg nachweisen. Bei Versuchen am Schaf beobachteten SHORT et al. (1963) einen begrenzten und vorübergehenden leichten Anstieg der Progesteronausschüttung in die Ovarvene bei intravenöser Injektion von LH aber auch von FSH. Deutlicher erschienen die Ergebnisse bei Perfusionsversuchen von DOMANSKI et al. (1967), die am 8. Zyklustag innerhalb von 2o-3o Minuten nach Beginn der LH-Perfusion einen signifikanten Anstieg der Progesteronkonzentrationen in der Ovarvene messen konnten. Allerdings erreichten sie denselben Effekt auch mit Prolaktinpräparationen, während FSH die Progesteronkonzentrationen senkte. Weitere Perfusionsversuche mit Corpora lutea von Schweinen und Schafen als der Mitte der Lutealphase wurden von COOK et al. (1969) durchgeführt. Sie konnten eine deutliche Steigerung der Progesteronsekretion durch LH bei Schweinen nachweisen, je 2 Versuchsschweine zeigten aber auch ähnliche Effekte nach einer FSH bzw. Prolaktinzufuhr. Bei den Perfusionsversuchen an 12 Schafen ergab sich in allen Fällen nach

LH-Applikation eine Steigerung der Progesteronproduktionsrate, bei 2 mit FSH behandelten Tieren war die Wirkung auf die Progesteronsynthese ähnlich, aber weniger deutlich. Eine Prolaktinverabreichung bei einem Schaf zeigte keinen Effekt. BAIRD et al., (1969) weisen bei Versuchen an Schafen, denen das linke Ovar an den Hals transplantiert wurde, nach, daß LH die Progesteronausschüttung unmittelbar steigerte, während Prolaktin ohne Effekt blieb. FSH hatte in diesen Untersuchungen während der Lutealphase ebenfalls keinen Einfluß auf die Progesteronproduktion, zu Beginn der Lutealphase bewirkte es jedoch eine Depression der Progesteronsekretion. Ähnliche Beobachtungen werden von KARSCH et al. (1971 a) beschrieben, die durch kontinuierliche LH-Verabreichung beim Schaf einen deutlichen Anstieg des Gewichtes und der Progesteronausschüttung des Gelbkörpers am 2o. Zyklustag gegenüber dem 12. Tag beobachteten, während dieselbe Versuchsdurchführung mit Prolaktin keinen Einfluß zeigte. In neuesten Untersuchungen konnten KARSCH et al. (1971 b) zeigen, daß durch kontinuierliche intravenöse Dauerinfusion geringer LH-Dosen die Lebensdauer der Gelbkörper des Schafes bis zum 3o. Tage nach der Brunst verlängert werden kann. Bereits 197o vermutet NALBANDOV aus den Erkenntnissen beim Schaf, daß durch Dauerinfusion niedriger LH-Dosen die Lebensdauer der Gelbkörper unbegrenzt verlängert werden kann.

Auch bei der Frau konnte ein Einfluß von Gonadotropin auf die Progesteronproduktion des Gelbkörpers nachgewiesen werden. STROTT et al. (1969) erzielten durch Verabreichung von HCG an normale zyklische Frauen eine erhöhte Ausschüttung von Progesteron und eine Verlängerung der Lutealphase und damit des Zyklus. Die gleiche luteotrope Wirkung von humanem LH, als auch von handelsüblichem HCG, konnten bei der Frau HANSON et al. (1971) nachweisen.Beide Gonadotropine vermochten die Progesteronsekretion zu steigern und den Zyklus zu verlängern. Bei beiden Gonadotropin-Präparationen wurden allerdings auch geringfügige FSH-Aktitäten nachgewiesen. Durch HCG

konnte auch die Lebensdauer und die Progesteronsynthese des Corpus luteum graviditatis der Frau (das ja nach dem 4o. Graviditätstag keine Bedeutung mehr für die Aufrechterhaltung der Gravidität besitzt) bis nach der Geburt erhalten werden. Dabei zeigten Dauerinfusionen von HCG bessere Wirkungen als i.m. Injektionen. (Le MAIRE et al. 1971).

Gonadotropineinflüsse auf das Corpus luteum und seine Progesteronsynthese können auch bei " in-vitro "-Versuchen demonstriert werden. Beim Schwein berichten COOK et al. (1967) und AAKVAAG (197o) über die Stimulierung der Progesteronsynthese im Lutealgewebe " in-vitro " durch LH oder HCG. Bei ähnlicher Versuchsdurchführung konnten KALTENBACH et al. (1966) die luteotrope Wirkung von LH und HCG beim Schaf nachweisen, während FSH keinen Effekt zeigte. Unter dem Einfluß von HCG produzieren Stutengelbkörpergewebe aus der Mitte der Lutealphase bei " in-vitro " Bedingungen ebenfalls erhöhte Progesteronmengen (CHANNING, 1969). Im Gelbkörpergewebe der zyklischen Frau kann die Progesteronsynthese durch LH oder HCG im Inkubationsansatz stimuliert werden (RICE et al., 1964). Bei den oben erwähnten Versuchen von Le MAIRE et al. (1971) wurde auch im Gelbkörpergewebe noch zum Zeitpunkt der Geburt die Progesteronsynthese durch HCG im " in - vitro " Ansatz gesteigert.

GOSPODAROWICZ (1969) konnte im Rattengelbkörpergewebe mit LH eine signifikante Steigerung der Progesteronsynthese herbeiführen. Mit PMSG gelang dies nur durch Inkubation mit hohen Dosen, LTH sowie FSH zeigten überhaupt keinen Effekt. LH-Mengen, die allein nicht luteotrop wirkten, konnten aber durch FSH potenziert werden.

Die Ergebnisse der " in-vitro " Versuche können aber nur einen begrenzten Aufschluß über die Beeinflussung der Progesteronsynthese geben, da bei diesen Versuchsbedingungen aus naheliegenden Gründen nicht sämtliche physiologischen Einflüsse des Organismus mit einbezogen werden können. Deshalb liefern die " in-vitro " Befunde sicherlich keinen definitiven Aufschluß über die Bedingungen " in-vivo ".

2.3.2.2. Bedeutung von Prolaktin

Prolaktin ist ein Hypophysenvorderlappenhormon, das von WHITE et al. (1937) erstmals in nahezu reiner Form isoliert werden konnte. Es gehört wie die Gonadotropine zur Gruppe der Proteohormone und besitzt ein Molekulargewicht von 24 2oo (PAPKOFF, 1969). Nachdem ASTWOOD (1941) bei der hypophysektomierten Ratte die Aufrechterhaltung des Gelbkörpers unter dem Einfluß dieses Hormons nachweisen konnte, wurde Prolaktin auch " luteotropes Hormon " (LTH) genannt und als drittes Gonadotropin neben FSH und LH betrachtet.

Die luteotrope Wirkung konnte bei Ratten und Mäusen im Laufe weiterer Untersuchungen auch vielfach bestätigt werden (TOBIN, 1942; LYONS et al., 1943; NELSON und PICHETTE, 1943; EVERETT, 1944, DESCLIN, 1948). Entgegen der Vermutung, Prolaktin würde bei sämtlichen Säugetieren luteotrop wirken, konnte dagegen bisher bei sehr vielen Spezies nachgewiesen werden, daß diese Funktion dem HVL-Hormon LH zuzuschreiben ist. Selbst bei Ratte und Maus wird die alleinige luteotrope Wirkung von Prolaktin neuerdings in Frage gestellt,da auch schon bei diesen Spezies LH als luteotroper Faktor nachgewiesen werden konnte (siehe vorhergehendes Kap. 2.3.2.1.). Die Bedeutung von Prolaktin für das Ingangkommen und die Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktionen konnte insbesondere bei kleinen Nagetieren gezeigt werden. So berichten MALVEN und SAWYER (1966), daß bei hypophysektomierten Ratten Gelbkörper, die nach induzierter Ovulation zunächst funktionsunfähig waren, nach einer Prolaktinverabreichung Progesteron, das durch die sog. deziduale Reaktion nachgewiesen wurde, zu produzieren begannen. Wurde dagegen die Prolaktinbehandlung über einen Zeitraum von mehr als 8o Stunden ausgedehnt,so wurde neben der luteotropen Wirkung bei einigen Tieren auch eine Degeneration des Gelbkörpergewebes nachgewiesen (MALVEN, 1969). Über ähnliche Versuchsergebnisse berichten AHMAD et al. (1969).

Mit Hilfe eines gaschromatographischen Progesteronbestimmungsverfahrens konnten GROTA und EIK-NES (1967) zeigen, daß 1 Stunde nach Verabrei-

chung hoher Prolaktin-Dosen (1o mg) an hypophysektomierte Ratten, ein deutlicher Progesteronanstieg zu verzeichnen war. Von der Wirkungslosigkeit intravenöser Prolaktininjektionen auf die Gelbkörper intakter Ratten berichten dagegen MARSH et al. (1966). Bei diesen Versuchen konnte neben einer geringfügigen Steigerung der 2o α - OH-Progesteronsynthese weder im Ovarvenenblut noch nach " in-vitro " Inkubation des Gelbkörpergewebes eine Erhöhung der Progesteronproduktion nach Prolaktin-Verabreichung gemessen werden.

In vergleichenden Versuchen konnten Mc DONALD et al.(1971) bei der hypophysektomierten Ratte zeigen, daß Prolaktin von Ratten die Gelbkörperfunktion länger (25,2) Tage aufrechterhält, als Prolaktin von Schafen (16,9 Tage). Genauere analytische Angaben über die Progesteronbiosynthese unter Prolaktineinfluß werden von ARMSTRONG et al. (1969/197o) gemacht. Sie behandelten intakte Ratten mit Prolaktin; bei der nachfolgenden " in-vitro " Inkubation der Gelbkörper so behandelter Ratten konnte eine vierfache Steigerung der Progesteronsynthese gemessen werden; parallel dazu ging die 2o α- OH-Progesteronsynthese zurück. Die Produktion an " Gesamt-Gestagenen " wurde dagegen durch die vorausgehende " in-vivo"-Behandlung nicht geändert. Nach Zusatz von LH in das Inkubationsmedium konnte jedoch eine zusätzliche Steigerung der"Gesamtgestagenproduktion " gemessen werden, die insbesondere auf einen höheren Progesteronanteil zurückzuführen war. Wurden die Gestagene im peripheren Blut gemessen, so konnte gezeigt werden, daß nach der Prolaktin-Behandlung der qualitative Effekt ähnlich den " in-vitro " Ergebnissen war. Es ergab sich eine Erhöhung von Progesteron und eine Senkung von 2o α - OH-Progesteron (ARMSTRONG et al., 1969). Wurden Ratten am 2. Tag nach der Ovulation hypophysektomiert, so konnte bei der anschließenden " in-vitro"- Inkubation der Corpora lutea eine Abnahme der Progesteronsynthese, bei adäquater Steigerung der 2o α - OH-Progesteronbildung nachgewiesen werden. Bei vorausgegangener Prolaktinbehandlung der Ratten stellte sich dagegen genau der umgekehrte Effekt ein

(ARMSTRONG et al., 197o). Beim Hamster besitzt Prolaktin ebenfalls eine Gelbkörper-erhaltende Wirkung. Die Lebensspanne des Corpus luteum graviditatis konnte durch Prolaktin sowohl bei hypophysektomierten, als auch bei intakten Hamstern, verlängert werden (TURNBULL und KENT, 1966). Über die Abhängigkeit der Progesteronproduktion speziell von Prolaktin beim Hamster wird auch von GREENWALD (1967) berichtet. Nach Ansicht von CHOUDARY und GREENWALD (1967) besteht beim Hamster ein luteotroper Komplex aus den HVL-Hormonen Prolaktin und FSH. Sie begründen diese Vermutung aufgrund von Versuchen mit graviden, hypophysektomierten Hamstern, bei denen die Trächtigkeit nur mit Kombinationen von FSH und Prolaktin aufrechterhalten werden konnte. Während des Zyklus wirkte die ektopische Hypophyse eines Spendertieres (Hamster), die in erster Linie als Prolaktinquelle angesehen wurde, nur dann luteotrop, wenn gleichzeitig FSH verabreicht wurde.

Ein luteotroper Komplex scheint auch beim Kaninchen vorhanden zu sein, obwohl, wie schon im vorhergehenden Kapitel (2.3.2.1.) erwähnt wurde, diese Spezies eine Sonderstellung in Bezug auf die Steuerung der Progesteronsynthese einnimmt, da hier Östrogene allein schon luteotrop wirken. Dies wird auch durch Untersuchungen von KEYES und ARMSTRONG (1968) bestätigt, die ein Hormon follikulären Ursprungs (eventuell Östrogene) für die Steuerung der Gelbkörper und ihrer Progesteronausschüttung verantwortlich machen. So konnte die Involution der Corpora lutea durch Hypophysektomie trächtiger Kaninchen in der 2. Woche der Gravidität durch Verabreichung von Kombinationen aus Prolaktin und FSH nur verzögert werden, während Kombinationen von Östradiol und Prolaktin die Funktion der Gelbkörper und damit auch die Gravidität wie unter normalen Verhältnissen aufrecht erhielten (SPIES et al., 1968). THIBAULT (1966) berichtet, daß bei Lämmern, die am Tag der (PMSG-HCG) induzierten Ovulation hypophysektomiert wurden und danach täglich Prolaktin verabreicht bekamen, am 2o. Tag nach der Ovulation normal erscheinende Gelbkörper hatten. Nach Behandlung mit Östrogenen und Prolaktin war der

Effekt nicht so deutlich. Weiterhin wird von THIBAULT (1966) über einen Versuch mit erwachsenen hypophysektomierten Schafen berichtet (Hypophysektomie am 2.-4. Zyklustag), die bis zum 9. oder 1o. Zyklustag normale Progesteronwerte (o,8 - 1,o ng/ ml Plasma) zeigten, vom 11.- 14. Tag fiel der Progesteronspiegel aber bis auf kaum nachweisbare Mengen ab. Dagegen ergaben sich nach Hypophysenstieldurchtrennung Progesteronmeßergebnisse, die bis zum 15. Zyklustag mit denen des normalen Zyklus vergleichbar waren. Dieser Befund wird auf eine Prolaktinwirkung zurückgeführt und damit begründet, daß durch die Hypophysenstieldurchtrennung die Abgabe von LH und FSH wohl erheblich vermindert, Prolaktin aber zunächst immer noch in ausreichenden Mengen vorhanden gewesen sein soll. Durch Hysterektomie am 9. Tag nach der Ovulation und Hypophysenstieldurchtrennung zwischen dem 29. und 36. Tag konnte der Progesteronspiegel noch etwa weitere 2 Wochen aufrechterhalten werden. Danach kam es zu einem deutlichen Progesteronabfall, obwohl die Anwesenheit von Prolaktin noch vermutet wurde. Letzteres Ergebnis führte zu der Hypothese, daß beim Schaf wahrscheinlich noch ein anderes Hormon für die Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktion notwendig zu sein scheint. Die neueren Untersuchungen über die Steuerung der Progesteronbiosynthese wie sie unter anderem für das Schaf in Kap. 2.3.2.1. wiedergegeben sind, zeigen, daß wohl auch bei dieser Spezies eher dem Gonadotropin LH in dieser Funktion eine Hauptrolle zuzusprechen ist.

2.3.2.3. Bedeutung des luteolytischen Faktors

Die Lebensdauer und die Funktionen des Corpus luteum hängen nicht allein von erhaltenden Faktoren ab. Neuere Experimente weisen vielmehr darauf hin, daß es aktive Mechanismen gibt, die das Corpus luteum ausschalten (" switch off ") und von größerer Bedeutung für die Lebensspanne des Corpus luteum sind, als die stimulierenden

hypophysären Einflüsse (SHORT. 1967). Am Beispiel des Meerschweinchens konnte bereits 1927 von LOEB gezeigt werden, daß der Uterus für die Lebensdauer des Gelbkörpers eine dominierende Rolle spielt, da bei diesen Spezies durch Hysterektomie die Gelbkörperphase verlängert werden konnte.

Daraus wurde gefolgert, daß bei Anwesenheit des Uterus ein aktives luteolytisches Prinzip wirksam wird.

Eine umfassende Zusammenstellung über die Beziehungen zwischen Uterus und Gelbkörper bei vergleichender Betrachtungsweise (" Comparative Aspects of Uterine - Luteal Relationships ") wurde 1969 von ANDERSON L.L., BLAND K.P. und MELAMPY R.M. veröffentlicht. Diese Autoren beschreiben bei unterschiedlichen Spezies, die bis zum Jahre 1969 ermittelten Ergebnisse über Beeinflussung des Gelbkörpers von Seiten des Uterus, wobei zu den einzelnen angeführten Versuchen genaue Literaturangaben gegeben werden. Im folgenden sollen daher u.a. lediglich die von ANDERSON et al. zusammenfassend beschriebenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen auszugsweise wiedergegeben werden: " Durch Hysterektomie wird die Einleitung der Gelbkörper-Rückbildung bei Spezies wie Meerschweinchen, Schafen und Kühen während des Zyklus, sowie bei pseudograviden Hamstern, Ratten und Kaninchen, hinausgezögert. Die Zerstörung des Endometriums durch mechanische Reize oder Giftstoffe verursacht ebenfalls eine verlängerte Aufrechterhaltung des Corpus luteum. Werden nur Teile des Uterus entfernt, so hat sich gezeigt, daß ab einer bestimmten Restmenge an funktionsfähigem Uterusgewebe die Rückbildung des Gelbkörpers ebenfalls nicht mehr bewirkt wird. Es scheint, daß der intakte Uterus oder uterine Gewebsstücke, die endometrale Drüsen enthalten, einen luteolytischen Faktor (Faktoren) produzieren, der die Degeneration des Gelbkörpers herbeiführt. Für die Spezies Schwein, Kuh, Schaf, Meerschweinchen und Hamster existiert sehr wahrscheinlich ein lokaler luteolytischer Effekt, der durch einseitige Dehnungsversuche des Uterus aufzeigt oder durch Transplantationsversuche mit Uterus und Ovar nachgewiesen werden konnte. In jedem Fall ist jedoch für den Ab-

bau des Gelbkörpers ein funktionsfähiges Endometrium erforderlich. Eine Verkürzung des Zyklus, d. h. vorzeitige Rückbildung des Gelbkörpers kann durch Reizung (Einlage von Fremdkörpern, intrauterine Injektionen) des Endometriums in den ersten Tagen nach Ovulation herbeigeführt werden. Dagegen kommt es durch dieselbe Behandlung in der zweiten Zyklushälfte zu einer Zyklusverlängerung " - (dies konnte auch in neueren Untersuchungen von GRUNERT und ESSER, 1971, bei Infusionsversuchen mit Lugol'scher Lösung bestätigt werden; siehe auch Kap. 2.3.3.1.)-

" Zum Nachweis luteolytischer Aktivitäten existieren auch " in-vivo " und " in-vitro " Versuchsmodelle. Dieser Nachweis gelingt zum Beispiel am hysterektomierten Hamster durch Herbeiführung einer vorzeitigen Luteolyse nach intraperitonealer Injektion der zu testenden Substanz oder Einlegen derselben in die Backentasche, sowie durch Beeinflussung des Wachstums von monolayer Gewebskulturen aus Schweine-Granulosazellen, bei Inkubation mit der zu untersuchenden Substanz". Ergänzend zu den Angaben von ANDERSON et al. (1969) kann noch hinzugefügt werden, daß bei der Frau noch kein deutlicher Hinweis auf luteolytische Faktoren uterinen Ursprungs gefunden werden konnte. Eine Entfernung des Uterus bewirkt keine Verlängerung der Lebensdauer der Corpora lutea (BELING et al., 197o). Auch durch die kontrazeptiv wirkende Uterusspirale (" coil "), die sicherlich einen Einfluß auf das Endometrium ausübt, wird - gemessen am zyklischen Geschehen - kein Einfluß auf die Gelbkörperfunktionen bewirkt. (ECKSTEIN, 197o).

Im Laufe der allgemeinen Untersuchungen, die sich mit dem Wirkungsmechanismus der Luteolyse befassten, wurde folgende Möglichkeit, zunächst rein spekulativ, in Erwägung gezogen, nämlich, daß es sich bei dem uterinen " Luteolysin " um eine vasokonstriktierende Substanz handelt, durch welche die Uterus-Ovarvene verengt und damit die Versorgung des Gelbkörpers auf einen kritischen Schwellwert reduziert wird und schließlich nicht mehr gewährleistet ist (DONOVAN, 1971). Eine solche gefäßverengende Substanz mit spezifischer Wirkung auf Venen, wurde in der Gruppe der Prostaglandine (2o - C - Fettsäure-

derivate) in Form des Prostaglandins $F_2\alpha$ ermittelt. (PHARRISS und WYNGAARDEN, 1969). Mit diesem Prostaglandin konnten PHARRISS und WYNGAARDEN (1969) die Pseudogravidität der Ratte von normalerweise 14 Tagen auf 7 Tagen verkürzen. Sie verabreichten dazu das Prostaglandin $F_2\alpha$ am 5. und 6. Tag der Pseudogravidität entweder in das Uteruslumen oder in die rechte Herzkammer. Durch die Ergebnisse von ALDRIDGE et al., (197o) und McCRACKEN et al., (197o), die feststellten, daß die veränderte Progesteronsekretionsrate nicht immer parallel mit den Veränderungen im ovariellen Blutfluß läuft, wird jedoch ein Hinweis gegeben, daß der luteolytische Wirkungsmechanismus nicht allein durch die Theorie der Gefäßverengung interpretiert werden kann. Die luteolytische Wirkung von Prostaglandin $F_2\alpha$ konnte inzwischen aber auch bei Hamster (GUTKNECHT et al., 1971), Meerschweinchen (BLATCHLEY und DONOVAN, 1969), Schaf (McCRACKEN et al., 197o) und Affe (KIRTON et al., 197o)nachgewiesen werden. Beispielsweise verursachte eine Prostaglandin $F_2\alpha$ - Verabreichung an Schafe mit transplantiertem Ovar einen Abfall der Progesteronsekretion um 5o % innerhalb einer Stunde (McCRACKEN et al., 197o). Beim Affen zeigte sich ein Abfall des Progesteronblutspiegels innerhalb von 24 Stunden auf Werte, die außerhalb des Meßbereiches (<o,2 ng) lagen (KIRTON et al., 197o). Beim Schaf scheint indes eine kontinuierliche Ausschüttung von " Luteolysin " notwendig, da bei dieser Spezies selbst die schon in Gang befindliche Gelbkörper-Degeneration gehemmt werden konnte, wenn durch Hysterektomie die vermutliche " Luteolysin-Quelle" entfernt wurde. Dabei durfte die Degeneration des Gelbkörpers allerdings nicht soweit fortgeschritten sein, daß die Progesteronkonzentrationen in der Ovarvene unter 3o µg/1oo ml Plasma gesunken waren (MOOR et al., 197o).
Eine endgültige Klärung des Wirkungsmechanismus der durch $F_2\alpha$ eingeleiteten Luteolyse konnte bisher jedoch noch nicht erbracht werden.

Bei Versuchen mit Östrogenen konnte ebenfalls ein Einfluß auf den luteolytischen Wirkungsmechanismus gezeigt werden. Wurden hypo-

physektomierte (2. Zyklustag) Schweine, die aber einen intakten Uterus hatten, ab dem 12. Zyklustag mit 5 mg LH und 5 mg Östradiol behandelt, so waren noch am 2o. Zyklustag normal funktionierende Gelbkörper vorhanden. In Parallelversuchen konnte die luteotrope Wirkung von alleiniger LH-Verabreichung an hypophysektomierten Schweinen nur dann erreicht werden, wenn am 12. Zyklustag gleichzeitig hysterektomiert wurde (siehe auch Kap. 2.3.2.1.; ANDERSON et al., 1965). Aus dem Vergleich dieser Versuche ergab sich die Vermutung, daß Östrogene die luteolytische Wirkung des intakten Uterus neutralisieren können. Bei Meerschweinchen konnte aber durch subkutane Implantation von Diäthystilböstrol zu Beginn des Zyklus (Tag 4 oder 5) eine Luteolyse bewirkt werden. An den Zyklustagen 9-13 und 11-13, bei gleichzeitig durchgeführter Hypophysektomie, bewirkte dagegen das Implantat eine Verlängerung der Gelbkörperphase (ILLINGWORTH, 1969). Beim Schaf hatten intramuskuläre Injektionen von 17ß - Östradiol in der Mitte des Zyklus (1o. - 12. Tag) eine Verringerung des Gelbkörpergewichts zur Folge (HAWK und BOLT, 197o). Gelbkörper-Degeneration durch Verabreichung von 17ß-Östradiol am 11. und 12. Zyklustag konnten auch STORMSHAK et al. (1969) beim Schaf nachweisen, dagegen war die Behandlung bei hysterektomierten Tieren erfolglos.
Aus den beschriebenen Untersuchungen wird die zentrale Stellung des Uterus für die Steuerung der Luteolyse deutlich, bisher ist jedoch noch nicht gelungen, das " Luteolysin" eindeutig zu identifizieren und die Wirkungsweise zu definieren.

2.3.3. Spezielle Befunde beim Rind

In Kapitel 2.2.1. wurde schon daraufhingewiesen, daß auch bei der Kuh das Corpus luteum sowohl während des Zyklus als auch während der Trächigkeit die Hauptproduktionsstätte für Progesteron ist.

Ähnlich wie im vorhergehenden Kapitel (3.2.) dargestellt, sollen im Folgenden die Einflüsse luteotroper und luteolytischer Faktoren speziell für die Kuh während des Zyklus und der Trächtigkeit betrachtet werden.

2.3.3.1. Während des Zyklus

Bei der Kuh gelang es bisher noch nicht über hypophysektomierte Tiere die Einflüsse dieses endokrinen Organs darzustellen, wie dies ja beim kleinen Nagetier in umfangreichen Versuchen geschehen ist. ANDERSON und OXENREIDER (1967) konnten aber eine Technik für die Durchführung der Hypophysenstieldurchtrennung bei der Kuh entwickeln. HENRICKS et al. (1969) führten diesen Eingriff am 2. Zyklustag durch und stellten fest, daß sich die Gelbkörper trotzdem zu normaler Größe entwickelten; ein weiteres Follikelwachstum wurde allerdings gehemmt. Die dabei gemessenen Veränderungen des Progesterongehaltes im Lutealgewebe und die Progesteronkonzentrationen in der Vena ovarica, sowie im peripheren Blut verliefen annähernd parallel. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden am 12. und 16. Zyklustag niedrigere Werte gemessen.

Da bisher keine praktikablen weitergehenden Möglichkeiten zur direkten Ausschaltung der Hypophyse vorliegen, wurde versucht, durch exogene Zufuhr von Hypophysenhormonen die Bedeutung derselben für die Progesteronbiosynthese zu ermitteln. Dazu wurden insbesondere Versuche angestellt, in denen die hemmende Wirkung des Ocytocin auf den Gelbkörper aufgehoben werden sollte. Den Einfluß von Ocytocin wiesen bereits 1959 ARMSTRONG und HANSEL nach, die nach Verabreichung dieses Hormons eine Degeneration der Corpora lutea, die sich in einer Verringerung des Gewichtes zeigte, feststellten. Eine ähnliche Beeinflussung der Progesteronsynthese wiesen STALPES und HANSEL (1961) nach. Dieser Effekt konnte auch von DONALDSON et al. (1965) nach Verabreichung von Ocytocin vom 2. - 6. Zyklustag deutlich gezeigt

werden, erfolgten die Ocytocin-Injektionen aber nur am 2. und 3. Tag, so traten keine signifikanten Veränderungen am Gelbkörper auf. Diese Ocytocinwirkung kann durch Verabreichung von HCG oder Hypophysenextrakten (SIMMONS und HANSEL, 1964) und LH oder HCG (DONALDSON et al., 1965) ausgeglichen, bzw. in eine Steigerung des Gewichtes, des Progesterongehaltes und der Progesteronkonzentration des Gelbkörpers umgekehrt werden. Nach Injektionen von HCG-Präparationen, bei denen die spezifischen biologischen LH-ähnlichen Eigenschaften durch eine Inkubation mit Harnstoff (6M Urea) ausgeschaltet worden waren (SCHMIDT-ELMENDORFF et al., 1962, ELLIS, 1961) konnten DONALDSON et al. (1965) diese Wirkung von HCG nicht mehr nachweisen und dadurch zu einer Objektivierung der Befunde beitragen. Prolaktin zeigte bei den oben beschriebenen Versuchen in keinem der Fälle eine luteotrope Wirkung. Aufgrund der anscheinend vom Zyklusstadium abhängigen Ocytocinwirkung wird auch vermutet, daß für die normale Gelbkörperentwicklung mehrere oder kontinuierliche luteotrope Stimuli notwendig sind (DONALDSON et al., 1965).

Eine Steigerung der Progesteronproduktion konnte auch durch exogene Gonadotropinzufuhr bei nicht hormonell vorbehandelten Tieren gezeigt werden. So konnten DONALDSON und HANSEL (1965 a) nach HCG-Verabreichung eine Steigerung der Progesteronkonzentrationen im Corpus luteum-Gewebe messen. Nach intravenösen Injektionen oder Infusionen von LH oder HCG an verschiedenen Zyklustagen (5,1o,15,2o) bei 3 Versuchskühen, wurde in 5o % der Versuche eine deutliche Steigerung des Progesteronblutspiegels gemessen (SCHOMBERG et al., 1967). HANSEL und SNOOK (197o) konnten bei einer Kalbin, der ein Ovar an die Vena jugularis transplantiert war, durch subkutane PMSG-Injektionen einen leichten und durch LH-Injektionen einen deutlichen Progesteronanstieg zeigen. Eine Verlängerung der Lebensdauer des funktionsfähigen Gelbkörpers bewirkten intramuskuläre Injektionen von Hypophysenextrakten oder LH (DONALDSON und HANSEL, 1965 b). Dagegen konnten SMITH et al.,

(1957) durch Prolaktinverabreichungen an den Zyklustagen 3-17, bei normalen Gelbkörperbefunden, keine Zyklusverlängerung feststellen.
In zahlreichen " in-vitro"-Versuchen konnte ebenfalls eine Steigerung der Progesteronsynthese durch LH erwiesen werden (MASON und SAVARD, 1964; MARSH und SAVARD, 1964; ARMSTRONG et al., 1964; SAVARD et al., 1965; ARMSTRONG und BLACK, 1966; HANSEL, 1967; SEIFART und HANSEL, 1968).

Bemerkenswert erscheinen hierbei die Angaben von ARMSTRONG et al. (1964), die durch LH-Zufuhr in Gelbkörpergewebe, das bis zum 18. Tag nach dem Östrus entnommen wurde, eine Steigerung der Progesteronsynthese messen konnten. Gelbkörper vom 19. Tag post Östrum konnten dagegen nicht stimuliert werden. In den " in-vitro"-Versuchen von HANSEL (1967) wurde der stimulierende Effekt des LH durch gleichzeitige Inkubation mit spezifischem Anti-LH-Serum aufgehoben, womit gezeigt werden konnte, daß der Progesteronanstieg nicht durch irgend einen anderen Serumbestandteil des Inkubationsmediums erzielt wurde. Dagegen fanden BARTOSIK et al. (1967) bei " in-vitro"-Perfusionsversuchen luteotrope Eigenschaften nicht nur bei LH, sondern auch bei Prolaktin.

Jedes dieser Hormone konnte die Progesteronsynthese steigern. Ein außergewöhnlicher Befund wurde bei Perfusion beider Ovarien ermittelt: Prolaktin allein steigerte nur die Progesteronsynthese des Ovars mit einem Gelbkörper, erfolgte aber die Perfusion mit Prolaktin und LH hintereinander, so konnte auch in " gelbkörperlosen" Ovarien eine erhebliche Steigerung der Progesteronsynthese nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zur Bestätigung dieser Befunde wurden in der Literatur nicht gefunden.
Zur Klärung des LH-Einflusses auf die Progesteronbiosynthese wurde von SNOOK et al. (1969) ein spezifisches, bovines Antiserum, das von Stuten gewonnen wurde, angewandt. Färsen, die am 1o. Zyklustag hysterektomiert wurden um persistierende Gelbkörper zu erzeugen, bekamen dieses Antiserum 2o Tage später - 5 Tage lang - subkutan ver-

abreicht. Aus dieser Behandlung resultierte eine deutliche Abnahme des Gelbkörpergewichtes, des absoluten Progesteron- und 20α - OH-Progesterongehaltes,sowie der Gesamtprogesteronkonzentrationen (Progesteron und 20α-OH-Progesteron). Dagegen veränderten sich die Progesteronkonzentrationen nicht. Eine ähnliche Anti-Serum-Behandlung bei intakten Färsen vom 2. bis 6. Zyklustag bewirkte eine signifikante Abnahme des Gelbkörpergewichtes und des absoluten Progesterongehaltes, während auch hier die Progesteronkonzentrationen keine auffallenden Veränderungen zeigten. Nach der Entfernung der Corpora lutea (Tag 11) kamen die Kontrolltiere innerhalb von 3-4 Tagen wieder in den Östrus, bei den behandelten Färsen betrug die durchschnittliche Zeitspanne bis zur nächsten Brunst 15,2 Tage.

In einem weiteren Versuch konnte von SNOOK et al.(1969) gezeigt werden, daß durch Antiserum-Behandlung während der Tage (16-2o) des Zyklus, eine Verlängerung des Zyklus auf insgesamt 36,7 Tage bewirkt wurde. Dieselbe Behandlung während der Tage 12-16 bewirkte dagegen nur eine Verlängerung des Zyklus auf insgesamt 28,5 Tage. Die Autoren schließen aus den ermittelten Ergebnissen, daß LH für die Erhaltung des Gelbkörpers eine dominierende Rolle spielt, daß jedoch, aufgrund des Ausbleibens einer vollständigen Gelbkörper-Rückbildung nach der Anti-Serum-Verabreichung, neben LH noch andere Faktoren für die Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktionen erforderlich sind. Die durch das Antiserum bewirkte Zyklusverkängerung wird eher in einer Hemmung der Follikelreifung, als in einer Hemmung eines luteolytischen Mechanismus gesehen.

Von KARG et al. (197o) wurde nach Verabreichung eines Anti-LH-Serums an eine Kuh am 12. und 13. Zyklustag eine deutliche Senkung des Progesteronspiegel im peripheren Blut gemessen. Bei einem weiteren Versuchstier wurde der gleiche Effekt, allerdings weniger stark ausgeprägt, erzielt. An diese Versuche schließen sich die eigenen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an.

Da die meisten der bisher gefundenen Versuchsergebnisse durch mehr oder weniger starke Eingriffe in den physiologischen Ablauf des Zyklus ermittelt

wurden, erhoffte man sich näheren Aufschluß über die Steuerung der Gelbkörperfunktion durch Bestimmung der endogenen Hormone unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Die hierfür notwendigen umfangreichen Hormonanalysen konnten jedoch erst in neuester Zeit, nach der Einführung spezifischer und für die Routine geeigneter Meßverfahren, durchgeführt werden (siehe auch " Methodischer Teil").

So ergab sich für die Verlaufskurve von LH im peripheren Blut, neben einem kontinuierlichen Basisspiegel von 1,5 - 2,o ng/ml Plasma während des Zyklus (SCHAMS und KARG, 1969) ein präovulatorischer Gipfelwert am Tage vor der Ovulation, mit einer maximal fast zehnfachen Konzentrationssteigerung (SCHAMS und KARG, 1969;Gay et al., 197o; HENRICKS et al., 197o). Eine zusätzliche signifikante Erhöhung um den 9. Tag nach der Ovulation wurde bei etwa 2o % der untersuchten Tiere von KARG et al. (1967) und KARG und SCHAMS (197o a) gefunden. Dieser physiologische Befund wurde inzwischen auch von HANSEL und SNOOK (197o) in ähnlicher Weise bestätigt.

Der präovulatorische LH-Peak wird als entscheidender Auslösungsmechanismus der Ovulation angesehen, wobei auch ein ausgeprägter zeitlicher Zusammenhang zwischen LH-Peak und Ovulation nachgewiesen werden konnte; daneben wird diesem Peak auch die Einleitung der Luteinisierung, d.h. die Bildung des Gelbkörpers zugeordnet (KARG und SCHAMS, 197o a). Der während der Mitte des Zyklus (ca. 9. Tag) festgestellten erhöhten endogenen LH-Ausschüttung wird von KARG et al. (1969), aufgrund der damit verbundenen Steigerung der Progesteronproduktion, eine mögliche luteotrope Funktion zugeschrieben. Eine deutliche luteotrope Funktion endogenen LH's konnten KARG et al. (197o) am Beispiel einer Kuh zeigen. Dieses Tier hatte eine physiologische Zyklusdauer von 3o Tagen. Wie die analytischen Befunde der LH- und Progesteronmessungen ergaben, zeigte sich bei diesem Tier, während des beginnenden Abfalls des Progesteronblutspiegels am 18. Zyklustag gleichzeitig ein LH-Peak, wonach wiederum eine Erhöhung des Progesteronblutspiegels folgte. Ein weiterer, am 27. Tag gemessener LH-Peak konnte das Corpus luteum-Gewebe nicht mehr zu einer

erneuten Syntheseleistung stimulieren; zu diesem Zeitpunkt waren die Progesteronkonzentrationen bereits auf Minimalwerte abgefallen. Bei Untersuchungen während des Zyklus konnten KARG et al.(1969) keine Zuordnungen des Prolaktinspiegels zu den zyklischen Vorgängen am Ovar sicher ableiten; ausgeprägter zeigte sich ein gewisser Tagesrhythmus. Bei Langzeituntersuchungen konnte auch eine gesicherte Abhängigkeit von der Jahreszeit festgestellt werden, wobei die Werte im Sommer höher lagen, als im Winter (SCHAMS und KARG, 197o).

Bei den Vorgängen zur Steuerung der Luteolyse kommt auch bei der Spezies Rind dem Uterus eine dominierende Rolle zu. Fremdkörper im Uterus bewirken eine Hemmung der Entwicklung oder Verkürzung der Lebensdauer des Corpus luteum (GINTHER et al., 1966). Eine verlängerte Zyklusdauer wurde von GRUNERT und ESSER (1971) durch intrauterine Infusionen von Lugol'scher Lösung in der Zeit vom 13. - 16. Zyklustag verursacht und auf Entzündungserscheinungen des Endometriums, wodurch die Produktionsstätten des vermutlichen luteolytischen Faktors zerstört wurden, zurückgeführt. Auf die Wirkung von Ocytocin-Injektioen wurde schon oben hingewiesen. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Ocytocin, entgegen anderslautenden Vermutungen, keinen Einfluß auf den LH-Blutspiegel hat. Es bewirkt jedoch eine vorzeitige Einleitung der Brunst, während der es zu der bekannten erhöhten LH-Ausschüttung kommt. Der Progesteronspiegel konnte durch Ocytocin erst ab dem 5. Zyklustag gesenkt werden HARMS et al., 1969), womit die eingangs dieses Kapitels erwähnten Ergebnisse von DONALDSON et al. (1965) unterstrichen werden. Die totale Hysterektomie bewirkt eine ausgedehnte Verlängerung und Erhaltung des Gelbkörpers und seiner Funktionen (WILTBANK und CASIDA, 1956; ANDERSON et al., 1962), wobei die Progesteronkonzentrationen 2o Tage nach der Hysterektomie den in der Mitte des Zyklus gemessenen gleichen (MALVEN und HANSEL, 1964); 9o Tage nach diesem Eingriff konnten ANDERSON et al. (1965) einen zusätzlichen Anstieg feststellen. Wird bei hysterektomierten Tieren (Hysterektomie Tag 8 - 11), 18 bis 26 Tage nach diesem Eingriff der Hypophysenstiel durchtrennt, so bleiben die Gelbkörper nur weitere 48 Tage funktionsfähig. Der Progesteron-

spiegel sinkt jedoch schon nach 6 Tagen auf ein Niveau, das dem des 16. Zyklustag nicht hysterektomierten Kontrolltieren gleicht und bleibt dann ziemlich konstant (HENRICKS et al., 1969).

Hohe Dosen (1,o - 1oo mg) von Östrogenen, verabreicht in der ersten Hälfte des Zyklus, bewirken in der zweiten Zyklushälfte eine Abnahme von Gewicht und Progesterongehalt des Corpus luteum (GREENSTEIN et al., 1958; WILTBANK et al., 1961 b; KALTENBACH et al., 1964). Bei niedereren Dosen von Östrogenen ist die Wirkung dagegen nicht so deutlich (NISWENDER et al., 1965).

Genauere Kenntnisse über den luteolytischen Mechanismus liegen jedoch auch für die Spezies Rind noch nicht vor.

2.3.3.2. Während der Trächtigkeit

Der Progesteronspiegel während der Trächtigkeit zeigt im peripheren Blutplasma, abgesehen von kleineren individuellen Schwankungen , einen nahezu kontinuierlichen Verlauf und bewegt sich bis kurz vor Eintritt der Geburt auf einem Plateau zwischen 5,o und 9,o ng/ml Plasma. Parallel dazu wurde während der gesamten Dauer der Trächtigkeit ein niedriger LH-Basisspiegel gemessen, wie er auch während des Zyklus, abgesehen von präovulatorischen Peaks, und des in einigen Fällen gemessenen " Mitte-Zyklus-Peaks", gefunden wird (SCHAMS et al., 1972). Die vereinzelt während des ersten Drittels der Gravidität im peripheren Blut ermittelten LH-Peaks (SCHAMS, 1969), die in ihrer Höhe teilweise dem präovulatorischen Peak gleichen, hatten keine Veränderungen des Progesteronblutspiegels zur Folge (SCHAMS et al., 1972). Diese LH-Peaks können eher im Zusammenhang mit der " Lockerwirkung " der Östrogene gesehen werden (KARG, 1968). Bekanntlich können beim Rind besonders im ersten Drittel der Trächtigkeit Brunsterschei-

nungen auftreten, die von Follikelbildung am Ovar begleitet sind (ROSSE, 1971) und keine Veränderungen des hohen Progesteronspiegels erkennen lassen (HOFFMANN, 1971 a).

Im Gegensatz zu den zitierten Befunden konnten jedoch MILLS und MORRISSETTE (197o) bei " in-vitro"-Perfusionsversuchen durch Zugabe von LH in Gelbkörpern, die während der frühen und späten Trächtigkeitsphase entnommen worden war, die Progesteronsynthese steigern.

Eine bei einer Kalbin am 51. Trächtigkeitstag durchgeführten Hypophysenstieldurchtrennung, führte zu keiner Degeneration des Corpus luteum graviditatis. Der nach der Tötung des Tieres (94. Tag) festgestellte Progesterongehalt im Gelbkörper lag sogar im Vergleich zu einem Kontrolltier höher; im Uterus war ein lebender Embryo vorhanden (HENRICKS et al., 1969).
Messungen des Prolaktinblutspiegels während der Zeit der Gravidität ergaben, daß dieses Hormon - ähnlich wie während des Zyklus - nicht als Regelfaktor für den Gelbkörper angesehen werden kann (KARG und SCHAMS, 197o b; SCHAMS und KARG, 197o).

Weitere Ergebnisse über die Steuerung der Funktionen des Corpus luteum wurden nicht gefunden.

3. Methodischer Teil

3.1. Tiermaterial und Versuchsplan

Die Tierversuche wurden auf dem Versuchsgut Veitshof der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität München durchgeführt. Es standen 2 Kühe und 3 Kalbinnen zur Verfügung. Die Blutentnahme geschah während der Versuche abwechselnd rechts und links durch Punktion der Vena jugularis, wobei jeweils ca. 5o ml Blut direkt in Plastikzentrifugengläser entnommen wurden. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurden vorher jedem dieser Gläser 15o µl des Heparinpräparates Liquemin (1 ml = 25oo USP - E. Heparin, Hoffmann- La Roche AG) zugegeben. Sofort nach der Entnahme wurden die Blutproben bei 4 ^{o} C und ca. 4ooo RPM, 12 Minuten lang zentrifugiert, das Plasma abgehebert und bei - 18 ^{o} C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt.

Die Bezeichnung, das Alter und die Rasse der für den Versuch verwendeten Tiere, sowie die Dauer ihrer letzten Brunstzyklen vor Versuchsbeginn, sind in Tab. 1 aufgeführt.

Die Versuchsdurchführung erstreckte sich über zwei Zyklen, die sich aus einem physiologischen Zyklus, dem " Kontrollzyklus " und dem Zyklus, in dem die Tiere mit Antiserum behandelt wurden, dem " Behandlungszyklus ", zusammensetzten.

Diese Einteilung wurde vorgenommen, um die bei den Zyklen erhobenen Befunde vergleichen und die Wirkung der Behandlung objektivieren zu können. Die Frequenz der Blutentnahme richtete sich dabei nach dem Zyklusstadium und der Behandlung mit Antiserum. Sie wurde vor und insbesondere während des Östrus und der Behandlungsphase gesteigert. Der dabei zugrunde gelegte Zeitplan wird in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 1

Tiermaterial

Tier	Alter (Jhr.)	Rasse	Dauer der letzten fünf Brunstzyklen (1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Kuh Kafeil (KKa)	4	Kreuzung: Fleckv. x Braunvieh	21	19	2o	19	19
Kuh Roni (KRO)	2 1/2	Braunvieh	25	21	22	23	2o
Kalbin 4 (K4)	1 1/2	Braunvieh	18	21	19	21	21
Kalbin 5 (K5)	1 1/2	Braunvieh	19	21	21	2o	19
Kalbin 6 (K6)	1 1/2	Braunvieh	19	2o	2o	22	21

3.2. Charakterisierung der Antisera

Die zur Behandlung der einzelnen Tiere benötigten Antisera wurden im eigenen Istitut von Herrn Dr. D. Schams nach Immunisieren von Kaninchen mit Rinder-LH (NIH-LH-S_1 - Standard-Präparation) und Rinder-Prolaktin

(NIH-P-B_2-Standard-Präparation) gewonnen.

Zur Charakterisierung der Spezifität der Antisera wurden mit Hilfe des Radio-Immuno-Tests (RIT) Kreuzreaktions-Prüfungen mit den beiden Standardpräparaten LH (NIH-LH-S_1) und Prolaktin (NIH-P-B_2) und den folgenden Proteohormonen durchgeführt:

Hochgereinigtes Schaf-FSH, hochgereinigtes Rinder-TSH (Dr. Pierce, USA), Rinder-STH (NIH-GH-B_{15}). Dabei zeigten Anti-LH- und Anti-Prolaktin-Serum gegen Prolaktin bzw. LH keine Kreuzreaktion, während das Anti-LH-Serum Kreuzreaktion mit FSH, sowie - wahrscheinlich aufgrund von Verunreinigungen - auch mit höheren Konzentrationen von STH und TSH zeigte. Das Anti-Prolaktinserum zeigte, wahrscheinlich ebenfalls aufgrund von Kontaminationen, eine gewisse Kreuzreaktion mit höheren Konzentrationen von STH. Bei Verwendung der Antisera im RIT lagen die Endverdünnungen beim Anti-LH-Serum bei 1 : 5oo ooo und beim Anti-Prolaktin-Serum bei 1 : 3oo ooo, d.h. bei dieser Verdünnung im Versuchsansatz, werden im RIT o,2 ng LH bzw. Prolaktin zu 5o % gebunden.

Von dem jeweiligen unverdünnten Antiserum wurde den einzelnen Tieren während des Behandlungszyklus am 11. Tag um 8.3o Uhr und 13.3o Uhr, sowie am 12. Tag um 13.3o Uhr, jeweils nach der Blutentnahme, in einer Oberschußdosis 3o ml intravenös verabreicht. Die Verabreichung der Antisera wurde auf diese Tage gelegt, da in dieser Phase des Zyklus wiederholt kurzfristige Erhöhungen des LH-Blutspiegels gemessen wurden (KARG und SCHAMS, 197o a, SNOOK und HANSEL, 197o). Die genauen Angaben über die zeitliche Durchführung der Behandlung, sowie die Art des verwendeten Antiserum, sind in Tab. 3 angegeben.

Tab. 2

Zeitplan der Blutprobenentnahme

Kontrollzyklus			Behandlungszyklus		
Zyklusperiode	Blutentnahme: Intervall (Stunden)	Uhrzeit	Zyklusperiode	Blutentnahme: Intervall (Stunden)	Uhrzeit
Tg.1 bis 2-3 Tg. vor Beginn des Östrus	24	8	Tg. 1 - 1o	4	8,12,16 Uhr usw.
2-3 Tage bis zum Östrus-beginn	4	8,12,16 usw.	Tg. 11		8, 9.3o, 11, 13, 15, 18, 21 Uhr
Während des Östrus bis zur Ovulation	2	8,1o,12 usw.	Tg. 12		8, 11, 14, 17 Uhr
			Tg. 13 bis zum Zyklus-ende		8 Uhr und 16 Uhr

Bei der Kalbin K5 mußte der Versuch am 22.1.71, einen Tag vor Beginn des Östrus, in dem das Tier normale Brunst und Ovulation zeigte, wegen einer fiebrigen Thrombophlebitis vorübergehend unterbrochen werden. Das Tier wurde erst 18 Tage später, am 9.2.71 (17. Zyklustag) wieder in den Versuch einbezogen; der sich anschließende Zyklus wurde als Behandlungszyklus gewertet. Bei der Kalbin K4 mußte der Versuch am 22.2.71 beendet werden, da das Tier infolge einer Darmperforation notgeschlachtet wurde.
Während der gesamten Versuchsdauer wurden bei sämtlichen Tieren durch rektale Palpation die Vorgänge am Ovar kontrolliert. Diese Untersuchungen wurden im Diöstrus durchschnittlich alle 2 Tage vorgenommen, vor bzw. im Östrus jedoch häufiger - maximal zweistündlich - um den Ovulationszeitpunkt möglichst genau festlegen zu können.

Tab. 3

Zeitschema: Durchführung des Tierversuches

Tier	eingesetztes Antiserum	Dauer des Kontrollzyklus	Dauer des Behandlungszyklus	Zyklustag 11 und 12
KKa	LH	3o.12.7o-18.1.71	19.1.71-13.1.71	29.1.71 3o.1.71
K5	LH	3.1.71 - 22.1.71 9.2.71 - 11.2.71	12.1.71- 6.3.71 x	22.2.71 23.2.71
K6	LH	9.1.71 - 3o.1.71	31.1.71-21.2.71	1o.2.71 11.2.71
KRo	Prol.	16.1.71 - 4.2.71	5.2.71-27.2.71	15.2.71 16.2.71
K4	Prol.	18.1.71 - 7.2.71	8.2.71-22.2.71 xx	18.2.71 19.2.71

x und xx siehe Text

3.3. Möglichkeiten zur quantitativen Messung von Progesteron in niedrigen Konzentrationsbereichen

3.3.1. chemisch-physikalische Verfahren

Zur Messung von Progesteron wurden am meisten angewandt:

Die Bestimmung des Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 24o mμ, die Bestimmung mit Hilfe von Doppelisotopen-Derivat-Verdünnungs-Methoden, sowie die Anwendung der Gaschromatographie. Bei allen diesen Methoden sind Extraktions- und - daran anschließend - intensive Reinigungsschritte (z.B. Papier- und Dünnschicht-chromatographie) erforderlich, um spezifische Ergebnisse zu gewährleisten. Bei Anwendung der UV-Spektroskopie müssen mehrere hundert ml peripheren Blutes entnommen werden, um überhaupt in den Meßbereich zu kommen, der hier im μg-Bereich liegt. Im Gegensatz dazu ist die Empfindlichkeit der Doppelisotopen-Derivat-Methoden wesentlich höher (ng-Bereich), man könnte also mit weniger Blut pro Analyse auskommen, die Methode ist jedoch sehr arbeitsaufwendig und störanfällig, da teilweise mit hohen Blindwerten, die bis zu 4o ng betragen können, zu rechnen ist (HAGERMANN und WILLIAMS 1969). Bei den gaschromatographischen Verfahren konnte die Empfindlichkeit durch die Einführung von Elektronen-Einfang-Detektoren zwar erheblich erhöht werden - der Meßbereich verschob sich vom oberen in den unteren ng-Bereich - wodurch für eine Bestimmung statt der bisher benötigten 1oo ml schon wenige ml peripheren Blutes genügten. Diese Methode erfordert jedoch komplizierte Extraktions- und Reinigungsschritte, sowie die Bildung eines Halogenderivates des zu messenden Steroides.

Aus den hier angeführten Nachteilen der aufgezeichneten Methoden, sowie auf Grund negativer Erfahrungen im eigenen Labor (Hoffmann, pers. Mitteilung), wurden diese Methoden für die vorgesehenen Untersuchungen von Anfang an nicht weiter in Betracht gezogen.

3.3.2. biochemische Verfahren

Neben den chemisch-physikalischen Verfahren zur Bestimmung von Progesteron, sind in den letzten Jahren vermehrt biochemische Verfahren in den Vordergrund getreten. Hierzu gehören insbesondere die Protein-Bindungsreaktionen, auf die in den nächsten Kapiteln im Detail eingegangen werden soll.

3.3.2.1. Prinzip der Protein-Bindungsreaktion

Das Vorkommen bestimmter Eiweißkörper im Organismus mit spezifischen Bindungsaffinitäten zu einigen Steroidhormonen ist schon länger bekannt. Es handelt sich dabei um gewisse Plasmaproteine (siehe Kap. 3.3.2.2.), sowie spezifische Rezeptor-Proteine in den Zellen der Erfolgsorgane. So konnten JENSEN und JACOBSON (196o), NOTEBOOM und GORSKI (1965) und JENSEN et al. (1966) im uterinen Zytoplasma ein spezifisches Bindungs-Protein für Östrogene nachweisen. Ein Rezeptor-Protein für Aldosteron konnten FANTESIL und EDELMAN (1966), HERMAN et al. (1968) und ROBINSON und FANTESIL (197o) im Zytoplasma von Rattennieren feststellen. Von MILGROM und BAULIEU (1968) wird erstmals für Progesteron im uterinen Zytoplasma von Ratten ein Bindungs-Protein beschrieben, das jedoch große Ähnlichkeit mit dem Corticosteroid bindenden Globulin (siehe Kap. 3.3.2.2.) aufweist. MAINWAIRING (1969) sowie BAULIEU und JUNG (197o) schließlich konnten die Bindung von Androstanolon an das Zytoplasma der ventralen Rattenprostata darstellen. Ein drittes Bindungsprotein, das natürlicherweise nicht vorkommt, konnte auf immunologischem Wege (siehe Kap. 3.3.2.3.) dargestellt werden.

Im Jahre 1963 gelang es MURPHY et al. erstmals über das Prinzip der Steroid-Protein-Bindung ein Verfahren für die Messung einiger Steroid-

hormone aufzubauen. Dem von ihr beschriebenen " competitive protein-bindung-assay " (kompetititve Protein-Bindungsreaktion), bei dem Plasmaproteine zur Anwendung kamen, lag ein Reaktionsschema zu Grunde, das sie wie folgt beschreibt:

" In einem " in-vitro "-System befinden sich Protein, freies Steroid und an Protein gebundenes Steroid in einem " dynamischen Äquilibrium ". Wird nun diesem " in-vitro "-System ein Steroidhormon zugesetzt, so muß sich ein neues Äquilibrium einstellen. Hierbei wird ein Teil des ursprünglich an Protein gebundenen Steroids aus seiner Bindung verdrängt.

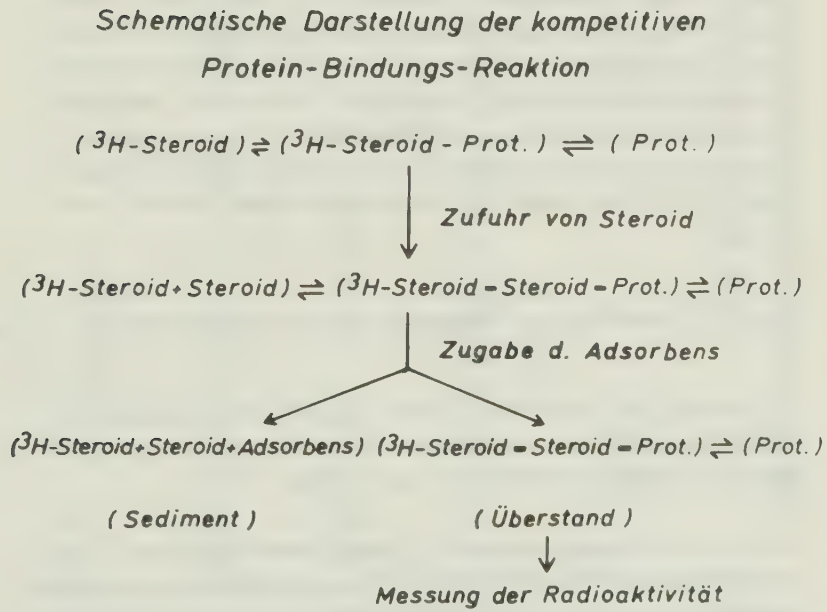
Diese Verdrängung ist über einen bestimmten Größenbereich proportional der dem " in-vitro "-System zugesetzten Steroidmenge. Wenn nun dieser Verdrängungsvorgang erfaßt werden kann, so können Rückschlüsse auf die Menge des zugesetzten Steroids gezogen werden. " In Abb. 4 ist dieses Reaktionsschema graphisch dargestellt.

Zur technischen Erfassung dieses Verdrängungsvorganges ist es notwendig, daß das zunächst an das Protein gebundene Steroid radioaktiv markiert ist und durch nicht markiertes Steroid verdrängt wird. Diese erforderliche Trennung der an Protein gebundenen von den nicht gebundenen, d.h., den freien Steroiden, gelang MURPHY bei ihren ersten Versuchen mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse.

Dieses von MURPHY beschriebene Verfahren erfuhr anfänglich keine weitere Verbreitung, da es weder zeitsparender noch empfindlicher war, als die bereits gut eingeführten chemisch-physikalischen Methoden. Erst als radioaktiv markierte Steroidhormone mit hoher spezifischer Aktivität (4o - 1oo Ci/ mM) erhältlich waren, konnte die Empfindlichkeit dieses Verfahrens erheblich gesteigert werden. Beruhend auf den Gesetzmäßigkeiten des Massenwirkungsgesetzes kann nun eine sehr kleine, an das Protein gebundene Steroidmenge mit hoher Impulszahl, durch eine ebenso geringe Menge nicht markierten, d.h., zu messenden Hormones, verdrängt werden.

Zu diesem großen Vorteil der hohen Empfindlichkeit kam als weitere Verbesserung der Methode ein Ersatz des ursprünglich verwendeten zeitraubenden Dialyseverfahrens zur Trennung der freien von den gebundenen Steroiden, durch Verwendung verschiedener Adsorbentien, wie dextranbeschichtete Holzkohle, Florisil, Fuller 's Erde, Lloyd's reagent (MURPHY, 1967). Eine schnelle Trennung der gebundenen von den freien Steroiden gelingt auch durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat (MAYES und NUGENT, 1968) oder Sephadex-Gel-Chromatographie (YOSHIMI und LIPSETT, 1968).

Abb. 4



Neben den anfangs verwendeten Plasmaproteinen, können auch spezifische Zellrezeptoren und Antikörper als Bindungsproteine für die Protein-Bindungsreaktion eingesetzt werden. In Anlehnung an den bei der Proteo-Hormon-Bestimmung eingesetzten Radioimmunotest (YALOW und BERNSON,1959),spricht man auch in der Steroidhormon-Analytik, bei Anwendung von Antikörpern, von einem Radioimmunotest (RIT).

Werden nun spezifische Zellrezeptoren oder spezifische Immunokörper in der Protein-Bindungsreaktion benützt, muß das von MURPHY beschriebene Prinzip der kompetitiven Protein-Bindungsreaktion in etwas abgeänderter Form eingesetzt werden. Beide Proteine weisen wesentlich höhere Assoziationskonstanten als die Plasmaproteine auf, die Bindung an spezifische Zellrezeptoren ist - ohne den Rezeptor zu zerstören - sogar irreversibel (JUNGBLUT, 1971). Aus diesen Gründen werden die koordinativen Bindungseigenschaften des Proteins für beide Steroidhormone, d.h. radioaktiv markiertes und nicht markiertes gleichzeitig ausgenützt, so daß sich, proportional zur Menge des unmarkierten Steroides im Inkubationsansatz, ein bestimmtes Äqulibrium von Anfang an einstellt. Die Darstellung dieses abgeänderten Reaktionsschemas der Protein-Bindungsreaktion wird in Abb. 5 gezeigt.

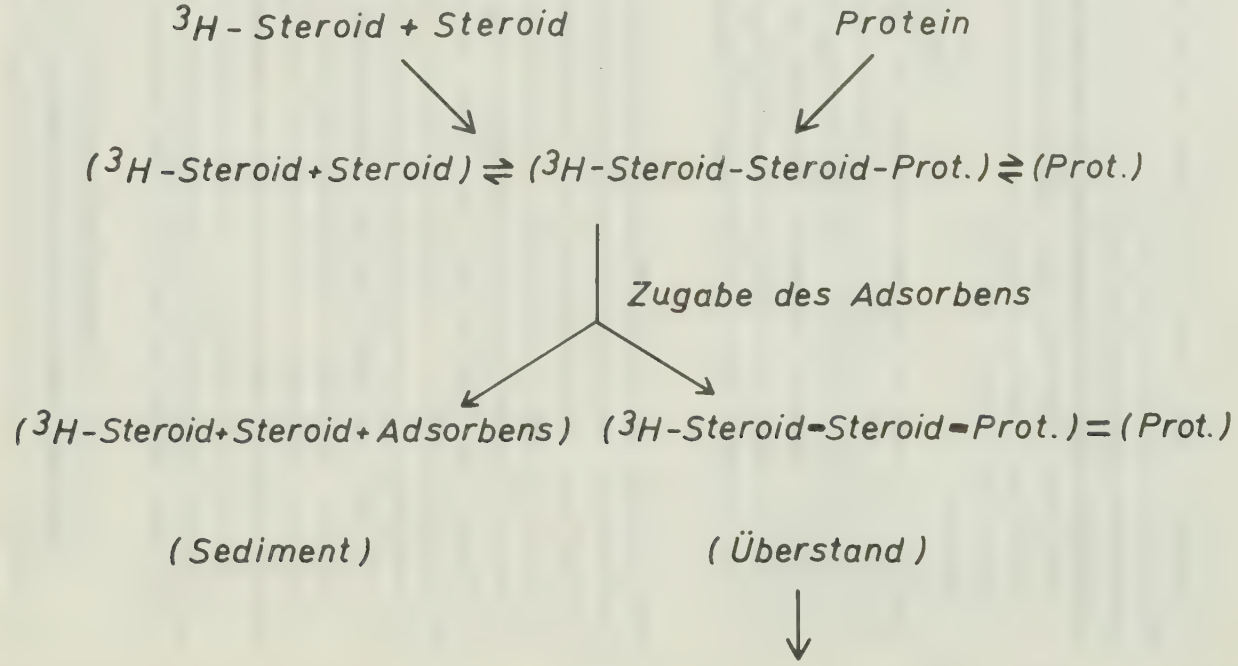
3.3.2.2. Verwendung von Plasmaproteinen als Bindungsprotein

Die Bindung von Steroiden an Proteine, es handelte sich dabei um Albumin, beschrieben erstmals BISCHOFF und PILHORN (1948), EIKNES et al. (1954) und WESTPHAL et al. (1955).

Bei der Untersuchung weiterer bestimmter Proteinfraktionen im Humanplasma isolierte DAUGHADAY 1957 und 1958 mit Hilfe eines Dialyseverfahrens ein α- Globulin mit starker Affinität zu den Glucocorticoiden, das er deshalb " corticosteroid binding globulin " (Corticosteroid bindendes Globulin = CBG) nannte. Diese Befunde wurden

Abb. 5

Schematische Darstellung der angewandten Protein - Bindungs - Reaktion



unter anderem auch durch elektrophoretische Studien von SLAUNWHITE und SANDBERG (1959) bestätigt, die das CBG des Plasmas erstmals auch als " Transcortin " bezeichneten.

Neben diesem Transcortin wurde bisher noch ein weiteres Plasmaprotein mit hoher Bindungsaffinität zu einigen Steroiden gefunden. Dieses Protein konnte von MERCIER et al. (1966) von Transcortin und Albumin abgetrennt werden. Es wurde als " Sex Steroid bindendes Globulin " (SBG) bezeichnet und hat zu den meisten 17-Hydroxysteroiden eine hohe Bindungsaffinität (HEYNS et al., 1969). Mit Hilfe dieser Plasmaproteine, in der Regel wurde HLPP (human late pregnancy plasma) verwendet, gelang es hochempfindliche Verfahren zur Bestimmung von Testosteron (HORTON et al., 1967; HALLBERG et al., 1968; MAYES und NUGENT, 1968; FRICK und KINCL, 1969; VERMEULEN und VERDONCK, 197o) und andere Androgene, die teilweise allerdings zunächst in chemisch reaktive Formen gebracht werden mußten (ROSENFIELD, 1969; MOSHANG et al., 197o und TREMBLAY et al., 197o) einzurichten. Auch gelang die Bestimmung von 17-ß-Östradiol bei Verwendung von HLPP als Bindungsprotein (MAYES und NUGENT, 197o; SYBULSKI, 1971).

In weiteren grundlegenden Arbeiten (MURPHY, 1967, SANDBERG et al., 1968; GUERIGUIAN und PEARLMAN, 1968; LEBEAU et al., 1969) konnte gezeigt werden, daß Transcortin - im Gegensatz zu seiner Bezeichnung " CBG " - auch andere C-21-Steroide, allerdings mit unterschiedlichen Affinitätseigenschaften von Spezies zu Spezies bindet.
Als Beispiel dafür ist auszugsweise eine Tabelle (Tab. 4) von MURPHY (1967) wiedergegeben.

Diese starken Kreuzreaktionen des Transcortins, nicht nur mit unterschiedlichen Corticoiden, sondern auch mit Gestagenen, ermöglichte es schließlich, auch ein Bestimmungsverfahren für Progesteron aufzubauen.

Tab. 4

Bindungsaffinität von Transcortin unterschiedlicher Spezies zu verschiedenen Steroiden.

Entnommen aus einer Tabelle von MURPHY, (1967)

Spezies	Plasmakonz. im Ansatz %	Steroide (rel. Bindung) F	B	S	P	H	E	T	A
Mensch	2,5	1oo	61	89	2o	47	9	4	3
Hund	1,25	1oo	67	75	4o	3o	5o	5	5
Katze	1,25	1oo	8o	125	45	5o	8o	0	0
Huhn	2,5	1oo	72	1oo	88	4o	1o7	1o	5

F = Cortisol
B = Corticosteron
S = 12, 21-dihydroxy- Δ^4-pregnen - 3,2o dion
P = Progesteron
E = Cortison
A = Aldosteron
H = Hydroxy - Δ^4- pregnen - 3,2o- dion

So beschrieben NEILL und Mitarbeiter (1967), nach den oben beschriebenen Prinzipien und Erfahrungen, eine detaillierte Methode zur Messung von Progesteron im peripheren Blut der Frau.
Von HOFFMANN und KARG (1969/7o) wurde dieses Verfahren modifiziert und

erstmals für die Progesteronbestimmung im peripheren Rinderblut angewandt. Die Protein-Bindungsreaktion wurde dabei nach einem genau einzuhaltenden Zeitplan durchgeführt, in dem alle Proben identische Reaktionsschritte durchliefen, wodurch die Genauigkeit des Verfahrens erhöht wurde. Eine weitere Verbesserung konnte durch Einführung eines internen Standards (siehe Kap. 3.4.2.2.3.)zur Berechnung der Aufarbeitungsverluste in den einzelnen Proben erreicht werden (HOFFMANN und KARG, 1971 a). Ähnliche Erfahrungen wurden auch von REEVES et al. (197o) gemacht.

Die eigenen Untersuchungen wurden zunächst in Anlehnung an das von HOFFMANN und KARG (1969/7o) beschriebene Verfahren vorgenommen.

3.3.2.3. Verwendung von Antikörper als Bindungsprotein

Die Messung von Hormonen auf immunologischem Wege, d.h., mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion, gelang erstmals YALOW und BERNSON(1959) bei der Bestimmung des Proteohormones Insulin im peripheren Blut des Menschen.

Die Steroidhormone (MG ≈ 3oo), wie auch andere niedermolekularen Verbindungen mit Molekulargewichten unter 3 ooo, haben jedoch keine immunogenen Eigenschaften (GOODFRIEND und SEHON, 197o; GROSS, 197o). LANDSTEINER (1933, 1945) konnte aber zeigen, daß gewisse niedermolekulare Verbindungen nach Koppelung an hochmolekulare Proteine antigen wirksam sind, wobei die niedermolelulare Verbindung (hier: Steroid) als Hapten wirkt, d.h. sie bewirkt als determinierende Gruppe des Antigens die Spezifität der Antikörper.

LANDSTEINER baute bei seinen Untersuchungen auf die Versuche von SACHS und KLOPSTOCK (1925) auf, denen durch Mischung von Cholesterin oder Lecithin mit Schweineserum die Gewinnung von spezifischen Antikörper gegen diese Lipide bei Kaninchen gelang.

Die chemische Darstellung von Steroid-Protein-Konjugaten gelang erst-

mals KING und FRANKS (1941) durch Koppelung von Östron an Kasein mit Hilfe von p-NH_2-phenyläther; allerdings wird über die Bildung von Antikörpern nicht berichtet. Eine ähnliche Steroid-Protein-Koppelung erreichten MOOSER und GRILICHESS (1941) durch Veresterung von Androstendiol (Androst-5en-3ß,17ß-diol) mit Hilfe von p-Anilin-Sulfonsäure (Sulfanilsäure) und darauffolgender Diazo-Koppelung mit Schweine- bzw. Pferdeserum und Kasein. Vermutlich aufgrund von Hydrolisierung der Ester " in-vivo" (WESTPHAL, 1971) konnten mit diesen Konjugaten keine Antikörper erzeugt werden.

Ähnliche Ursache dürfte beim Mißlingen der Antikörperproduktion von GROß und GOLDBERG (1949) vorgelegen haben, die Androstendiol, sowie Östradiol veresterten und dann mit Protein koppelten (WESTPHAL 1971). SPRUNT et al. (1951) gelang es aber, ein Antiserum gegen Östradiol-Albumin-Konjugat zu gewinnen; allerdings werden über die Koppelungstechnik keine näheren Angaben gemacht. Grundlegende Untersuchungen über die Herstellung geeigneter Steroid-Protein-Konjugate unterschiedlicher Zusammensetzung zur Gewinnung von Immunkörpern, wurden jedoch erst vor ungefähr 1o Jahren an der Columbia Universität von ERLANGER et al.1957 und 1959; BEISER et al. 1959 und LIEBERMANN et al. 1959, sowie an der Mc Gill-Universität von GOODFRIEND und SEHON, 1958, 196o, 1961 a, 1961 b; und GOODFRIEND et al. 1961, parallel und unabhängig voneinander vorgenommen. Schließlich gelang es NERI et al.(1964) an der Columbia Universität durch Immunisierung von Kaninchen mit Testosteron - , Östron -, Cortisol- und Aldosteron - Rinderserumalbumin (RSA) - Konjugaten, Antikörper zu gewinnen. Bei ähnlichen Versuchen mit weiblichen Schafen als Antikörperproduzenten, konnten ZIMMERING et al. (1967) über die Herstellung von Antikörpern gegegen RSA-Konjugate mit Testosteron-17-hemisuccinat, Testosteron-3- (o-carboxymethyl)-oxim und Progesteron-2o-(o-carboxymethyl) - oxim berichten.

Alle diese Antisera besaßen jedoch noch eine begrenzte Spezifität und waren aufgrund ihrer niedrigen Assoziationskonstanten von $1o^5$ - $1o^8$

L/M (DAY, 1966) nicht geeignet, um in einem radioimmunologischen Testverfahren als empfindliches und spezifisches Bindungsprotein eingesetzt zu werden.

Erst 1968 gelang es FERIN et al. durch Immunisierung eines weiblichen Schafes mit 17β-Östradiol-succinyl-RSA, ein Antiserum zu gewinnen, dessen Assoziationskonstante sehr hoch, bei 10^9 L/M, lag und damit für einen RIT geeignet war. Mit diesem Antiserum konnte ABRAHAM (1969) erstmalig ein radioimmunologisches Meßverfahren zur Östrogenbestimmung im peripheren Blut der Frau aufbauen. Inzwischen wurde in weiteren Puplikationen von der Herstellung mehr oder weniger spezifischer Antisera mit hohen Assoziationskonstanten gegen Östrogene und andere Steroide berichtet(GROSS et al. 1968; GROSS 197o; JUNGBLUT et al., 197o; THORNEYCROFT et al. 197o und TILLSON 197o). Nachdem die Spezifität der Antikörper stark von der Position der Koppelung " Steroid-Protein" im Antigen abzuhängen scheint (MIDGLEY und NISWENDER, 197o) werden nun vermehrt Antigene, bei denen die determinierenden Gruppen durch die Koppelung mit RSA nicht beeinträchtigt werden (EXLEY et al. 1971; LINDNER et al. 197o/1972, KUSS und GOEBEL 1971/1972), eingesetzt.

Nach der Gewinnung geeigneter Antikörper wurden insbesondere auf dem humanmedizinischen Sektor radioimmunologische Östrogenbestimmungen durchgeführt (ABRAHAM et al.; 197o, JIANG und RYAN; 1969, MIKHAIL et al., 197o; NISWENDER und MIDGLEY, 197o).

Mittlerweile ist es auch gelungen, Aldosteron (BAYARD et al., 197o, MAYES et al., 197o), Progesteron (ABRAHAM et al., 1971; FURUYAMA und NUGENT, 1971) und Testosteron (MIDGLEY et al., 1969) nach Darstellung von Antikörpern, auf radioimmunologischem Wege zu bestimmen. Für die zwei letztgenannten Hormone bestehen zwar bei Anwendung von Plasmaproteinen zufriedenstellende Verfahren, trotzdem ist man bestrebt, an Stelle der Plasmaproteine Antikörper einzusetzen, da diese trotz teilweise noch unbefriedigender Spezifität höhere Assoziationskonstan-

ten besitzen und somit ein empfindlicheres und für Störsubstanzen weniger beeinflußbares Meßverfahren garantieren. Im Vergleich zur radioimmunologischen Proteohormonbestimmung sind aber bei den Steroidhormonbestimmungen in der Regel noch vorherige Extraktionen und teilweise auch zusätzliche Reinigungsschritte, z.B. Dünnschichtchromatographie und Celite- bzw. Sephadexsäulenchromatographie erforderlich.

Die erste radioimmunologische Östrogenbestimmung im peripheren Rinderblut gelang HOFFMANN und KARG (1971 b). Das dabei eingesetzte Antiserum wurde von Kaninchen gewonnen, denen als Antigen 2', 4', NH_2-Östradiol (hergestellt nach einer Vorschrift von JUNGBLUT et al., 197o) oder 17ß-Östradiol-succinyl-RSA (NIH-Präparation) verabreicht wurden. Ein RIT zur Progesteronmessung im peripheren Rinderblut, konnte ebenfalls hier zum erstenmal aufgebaut werden (siehe Kap. 3.4.3.), nachdem von Dr. B. Furr, Reading, England, freundlicherweise Progesteron-Antiserum zur Verfügung gestellt wurde.

3.4. Angewandte Verfahren zur Bestimmung von Progesteron

3.4.1. Material und Reagentien

Als besondere Glaswaren zur Progesteronbestimmung wurden 15-ml-Zentrifugengläser mit Schliffstopfen für die Extraktion und 7,7 x 1,4 cm - Einweggläser für die Protein-Bindungsreaktion eingesetzt. Zum Abhebern des Petrolätherextraktes dienten Einweg-Pasteurpipetten.

Auf die Säuberung der verwendeten Glaswaren wurde besondere Sorgfalt gerichtet. Sie wurden unmittelbar nach Gebrauch mit Leitungswasser und vergälltem Alkohol abgespült und dann für mindestens 12 Stunden in einer 5 %-igen Deconex-Lösung (Borer Chemie, Solothurn-Schweiz) belassen. Erst dann erfolgte die gründliche Reinigung mit Bürste und Seifenlösung, wonach die Gläser 2o-mal gespült und an-

schließend im Trockenschrank getrocknet wurden. Die Sweep-Eluter wurden nach Gebrauch mit Methanol gründlich durchgespült und nach einer kurzen Waschung mit Aceton etwa eine Stunde lang bei 1oo° C getrocknet. Alle verwendeten Lösungsmittel bis auf Dioxan (Merck: reinst), Petroläther und Äther pro narcosi (Dab 7, Fa. Hoechst), waren p.A. Qualität und wurden vor Gebrauch destilliert. Der Petroläther (Siedebereich 5o - 7o° C, p.A. Merck) wurde einem speziellen Reinigungsverfahren unterworfen. Nach dreimaliger Waschung mit konzentrierter Schwefelsäule (p.A.), wurde jeweils zweimal mit Aqua dest. und gesättiger Natriumbikarbonatlösung nachgewaschen, bis der pH-Wert des Aqua dest. erreicht war. Dies war meist nach 2-3 Waschungen der Fall. Der so gereinigte Petroläther wurde anschließend über " Calciumchlorid für Trocknungszwecke " (gekörnt) mindestens 12 Stunden lang getrocknet und dann destilliert. Die Fraktionen zwischen 54 ° C und 67 ° C wurden gesammelt.

Als Adsorbens für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel (MN-Hr/UV 254 m μ) verwendet. Dieses wurde vor Gebrauch mit heißem Methanol zweimal gewaschen und dann bei 1oo ° C über Nacht getrocknet. Zur Beschichtung der Platten wurde dieses im Verhältnis 1:2 mit destilliertem Wasser gemischt und dann mit Hilfe eines Desaga-Streichgerätes auf 2o x 2o cm Glasplatten in einer Schichtstärke von o,2 mm aufgetragen. Anschließend wurden die Platten eine Stunde lang bei 1oo ° C aktiviert.

Zum Absaugen und Eluieren des Kieselgels von der Dünnschichtplatte wurde anfangs ein sogenannter " Sweep-Eluter " (HOFFMANN und KARG 1969/197o; MÄRZ 1971), der mit einer G4-Fritte ausgestattet war, benützt. Dieser Sweep-Eluter wurde später durch Einweg-Pasteurpipetten ersetzt, deren Spritzen bis auf ca. 1,0 cm verkürzt wurden und die anstelle von Glasfritten mit einer ca. 1,5 cm dicken Glaswolleschicht versehen waren. Die Glaswolle wurde vor Gebrauch mit heißem Methanol

gewaschen. Mit Hilfe eines Spatels wurde das Kieselgel direkt auf das Glaswollefilter gebracht. Florisil (aktiviertes Magnesiumsilikat, 6o - 1oo mesh, Fa. Schuchardt München), wurde mit Aqua dest. ausgeschüttelt. Nach Beendigung der Durchmischung wurde das überstehende Wasser sofort abgesaugt, um die schwebenden Florisilpartikel zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde so lange wiederholt, bis alle langsam absinkenden Florisilteilchen entfernt waren. Dann wurde das Florisil über Nacht bei 1oo ^{o} C getrocknet.

Holzkohle (Norit A. Partikelgröße 4o - 7o μ) und Dextran (MG 6o ooo - 9o ooo) wurden von Fa. Serva, Heidelberg bezogen. Der Phosphatpuffer (pH 7,2, o,15 m mit o,oo5 m Natriumazid, das entspricht 2,686 g Kaliumhydrogenphosphat, 8,356 g Dinatrium-hydrogenphosphat und o,325 g Natriumazid auf 1 l Aqua dest.) wurde stets im Kühlschrank bei 4 ^{o}C aufbewahrt und alle 4 Wochen frisch angesetzt.

Schwangerenplasma wurde großzügigerweise von der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Weiteres Humanplasma stammte von freiwilligen Spendern aus dem Institut.
Hühnerplasma wurde uns vom Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels, Oberschleißheim der Universität München, über lassen.

Hundeplasma wurde durch Punktion der Vena jugularis von Versuchshunden der Chirurgischen Tierklinik, der Universität München, gewonnen.

Die Gewinnung der jeweiligen Blutplasmen erfolgte, wie in Kap. 3.1. beschrieben.

Die mit Tritium markierten radioaktiven Standardpräparate, Corticosteron - 1α, 2α, - T (spezifische Aktivität 44 Ci/mM) und Progesteron - 1α , 2α - T (spezifische Aktivität 41 Ci/mM) wurden vom Radiochemical Centre Amersham bezogen. Die Identität und radio-

chemische Reinheit der Präparate wurde durch Vergleichs- und Mischchromatogramme mit nicht markierten Standardsubstanzen festgestellt.
Das nicht radioaktiv markierte ("kalte") Progesteron (Fa. Syntex, Palo Alto), wurde mit Hilfe der Papier- und Dünnschichtchromatographie, sowie Schmelzpunktbestimmung , auf Reinheit und Identität überprüft.

Die Scintillationsflüssigkeit (Bray's Solution) - bezogen auf 1 Liter Volumen- setzte sich wie bei NEILL et al. (1967) angegeben, aus 7 g POP (2,5-Diphenyloxazol), o,3 g POPOP (1,4 ,-bi-2- 4 - Methyl-5-Phenyloxazolyl-Benzol) und 1oo g Naphtalin (für Scintillationsmessungen, Fa. Merck), gelöst in 1 Liter Dioxan, zusammen.

Als Zählkuvetten wurden Niederdruck-Polyläthylen-Zählfläschchen der Fa. New England Nuclear und der Fa. Packard verwendet.

Alle quantitiven Pipettiervorgänge wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Mikroliterpipetten - " Marburg " durchgeführt.

3.4.2. Verfahren bei Verwendung von Transcortin als Bindungsprotein

Bei Verwendung von Transcortin in der Protein-Bindungsreaktion zur Bestimmung von Progesteron bieten sich verschiedene Möglichkeiten der Versuchsdurchführung an. Die dazu angestellten Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.4.2.1. Vorversuche

3.4.2.1.1. Charakterisierung des Transcortins verschiedenen Ursprungs.

Wie in Kap. 3.3.2.2. angeführt, weist Transcortin unterschiedliche

speziesbedingte Bindungsaffinitäten zu den einzelnen Steroidhormonen auf. Aus diesem Grund war es notwendig, zunächst die Eigenschaften des Transcortins im Plasma der verschiedenen, für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung stehenden Spezies, zu überprüfen.

3.4.2.1.1.1. Verfahren zur Bestimmung der Bindungskapazität

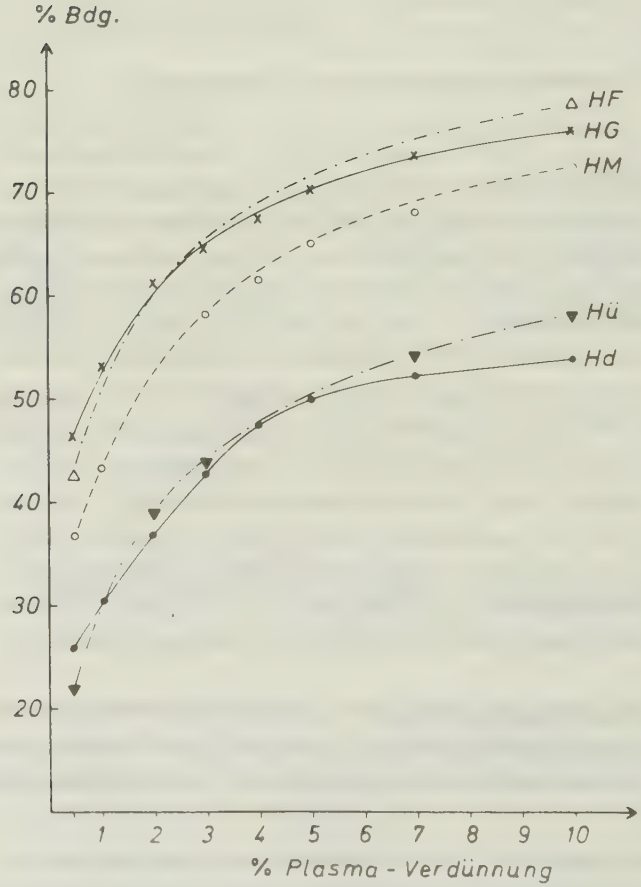
Bei diesem Verfahren sollte erfaßt werden, in wie weit radioaktiv markiertes Corticosteron durch das Transcortin im Plasma der einzelnen Spezies gebunden wird. Aus Gründen der Testempfindlichkeit sollte es sich bei diesem radioaktiv markierten Corticosteron um eine möglichst geringe Menge handeln, deren Radioaktivität aber gleichzeitig von unseren Zählgeräten (Flüssigkeitsscintillationszähler) in einer noch gut statistisch erfassbaren Impulsmenge gezählt werden kann. Diese Menge wurde schließlich, ausgehend von der spezifischen Aktivität des ^{3}H-Corticosterons und den Ansprüchen an die Empfindlichkeit der Messung, auf ungefähr 2oo pg pro Inkubationsansatz festgelegt, die für Testzwecke in o,1 ml Phosphatpuffer gelöst, eingesetzt wurden. Mit Hilfe dieser, von nun an als Vorlage bezeichneten Isotopenverdünnung, wurde die Bindungskapazität des Transcortins in den einzelnen Plasmen ermittelt, wobei nach folgendem Versuchsansatz vorgegangen wurde:

o,1 ml Vorlage werden nach Zugabe von o,1 ml Phosphatpuffer mit o,5 ml unterschiedlicher Plasmaverdünnungen (1:1o bis 1:1oo) inkubiert, wobei die Protein-Bindungsreaktion wie in Kap. 3.4.2.2.2. beschrieben, durchgeführt wird.

Im Rahmen der Vorversuche für die eigenen Untersuchungen wurden verschiedene Plasmen, die für die kompetitive Protein-Bindungsreaktion als geeignet beschrieben wurden (MURPHY 1967, JOHANSSON 1969, HOFFMANN und KARG 1969/197o), untersucht. Hierzu wurden die bereits in Kap. 3.4.1.

Abb. 6

Bestimmung der Bindungskapazität in Plasmaproben von unterschiedlichen Spezies



HF = Humanplasma feminin
HG = " gravid
HM = " maskulin
Hü = Hühnerplasma
Hd = Hundeplasma

genannten Blutplasmen gewonnen und, wie oben beschrieben, auf ihre Bindungskapazität geprüft. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede. In Abb. 6 ist als Beispiel das Ergebnis von fünf verschiedenen Plasmaproben, unterschiedlicher Herkunft dargestellt.

Die Abbildung zeigt, daß die Bindungskapazität des Humanplasma signifikant höher liegt als die von Hunde- und Hühnerplasma. Die Unterschiede innerhalb der Spezies " Mensch " sind dagegen geringfügig. Bei der Auswahl der Plasmaverdünnung für die Protein-Bindungsreaktion wurde ein Bereich gewählt, in dem etwa 5o - 6o % des vorgelegten ^{3}H-Corticosterons gebunden wurden, d.h., daß ^{3}H-Corticosteron im Oberschuß vorliegt. Unter diesen Bedingungen werden bereits geringe Mengen des zugegebenen nicht markierten Steroides (Progesteron) eine deutlich meßbare Gleichgewichtsveränderung herbeiführen.

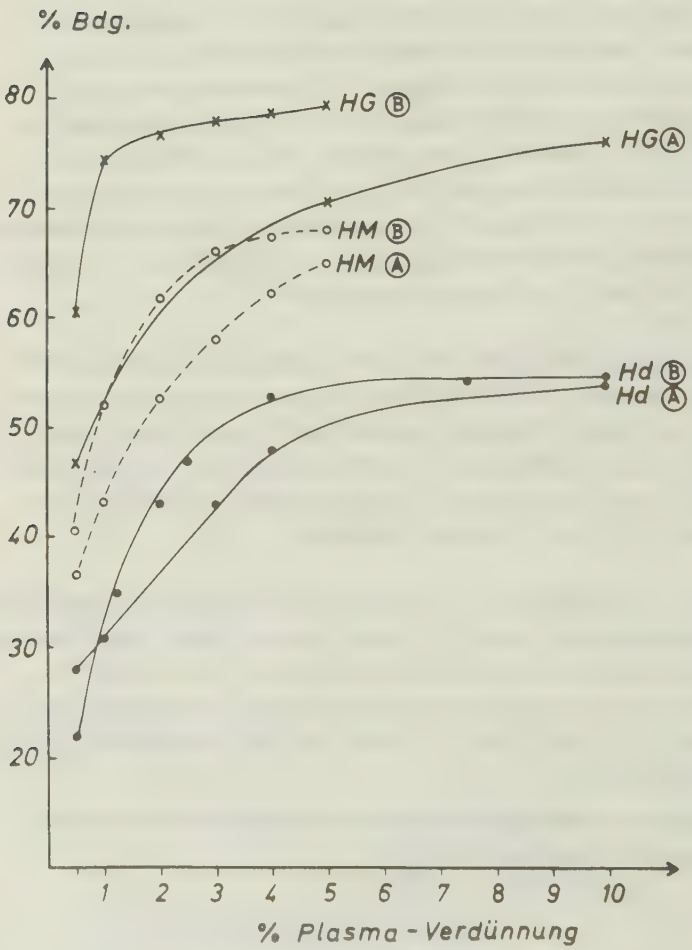
Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, daß die Bindungskapazität der einzelnen Plasmaproben erhöht werden konnte, wenn die ursprünglich im Plasma vorhandenen endogenen Steroide vorher durch Adsorption an Holzkohle entfernt worden waren. Gleichzeitig ergaben sich durch diese Behandlung besser reproduzierbare Testbedingungen. Der Effekt dieser Behandlung ist in Abb. 7 graphisch dargestellt.

Während bei den Plasmaproben A, also den nicht mit Holzkohle behandelten, die Bindungskapazität allmählich (meist schon bei einer Verdünnung von 1:2o) abnimmt, zeigen die gleichen Plasmaproben nach der Behandlung (Plasmaproben B) ein länger anhaltendes Plateau (bis zu einer Verdünnung von 1:3o, bzw. 1:1oo) mit einem plötzlich einsetzenden Abfall der Bindungskapazität.

Die Entfernung der endogenen Steroide durch Adsorption an Holzkohle ist im nächsten Kapitel beschrieben.

Abb. 7

Bestimmung der Bindungskapazität in verschiedenen Plasmaproben vor (A) und nach (B) Entfernung der endogenen Steroide



HG = Humanplasma gravid
HM = " maskulin
Hd = Hundeplasma

3.4.2.1.1.2. Ansatz der Transcortinlösung

Auf Grund der in den Voruntersuchungen ermittelten Ergebnisse wurde bei allen weiteren Verfahren ausschließlich Humanplasma als Transcortinquelle für die Durchführung der Protein-Bindungsreaktion herangezogen.

Zur Entfernung der endogenen Steroide wurden ca. 3-4 ml Humanplasma mit Phosphatpuffer (1:1) verdünnt und nach Zugabe einer Spatelspitze Holzkohle 1o Minuten lang bei 37 °Cgeschüttelt und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 18 ooo RPM, 3o Minuten lang zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abgehebert und, um häufiges Auftauen zu vermeiden, in kleinen Portionen bei -18 °C aufbewahrt. Wenn nach mehrmaligem Auftauen dieser Proben Fibrinflockenbildung zu beobachten war, so konnten diese ohne weiteres abgefiltert werden.

Für die Durchführung der Protein-Bindungsreaktion wurde die Plasmaverdünnung, d.h. die " Transcortinlösung", zunächst ähnlich, wie von NEILL et al.(1967) beschrieben, angesetzt:
39,o ng ^{3}H-Corticosteron, gelöst in 3oo µl Äthanol/Benzol (1:1), wurden in einem Erlenmeyerkolben unter Stickstoff bei 4o °C niedergetrocknet. Entsprechend der bei der Bestimmung der Bindungskapazität festgelegten Plasmakonzentration wurden 1-2 ml (o,5-1%) des verdünnten Humanplasmas dazugegeben und mit Phosphatpuffer auf 1oo ml aufgefüllt. Diese Transcortinlösung konnte ohne negative Beeinflussung bis zu 3 Tagen im Kühlschrank aufgehoben werden.
Bei Verwendung dieses Ansatzes muß die Protein-Bindungsreaktion wie in Kap. 3.3.2.1. beschrieben, durchgeführt werden, d.h. ^{3}H-Corticosteron muß durch kaltes Progesteron aus seiner Bindung verdrängt werden.

Im Rahmen von Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, daß die Standardkurven erheblich verbessert werden konnten, wenn die Vorlage (d.h. ^{3}H-Corticosteron) mit Progesteron im Testglas gemischt vorlagen und erst dieser Mischung die Plasmaverdünnung, d.h. die Transcortinlösung ohne ^{3}H-Corticosteron, zugesetzt wurde. Diesem Ansatz der Protein-Bindungsreaktion lag das Kap. 3.3.2.1. in Abb.5 dargestellte Reaktionsschema zugrunde. Die koordinativen Bindungseigenschaften des Proteins kommen hier gleichzeitig für beide Steroide zur Wirkung, wodurch sich proportional zur Menge des unmarkierten Steroides im Inkubationsansatz ein bestimmtes Äquilibrium von Anfang an einstellt.Es erwies sich ferner als günstig, die entsprechende Transcortinlösung erst unmittelbar vor ihrer Verwendung anzusetzen.

3.4.2.1.2. Durchführung der Protein-Bindungsreaktion unter Verwendung von Florisil bzw. Holzkohle als Adsorbentien

In den ursprünglich beschriebenen Bestimmungsverfahren (HOFFMANN und KARG, 1969/197o) für Progesteron im peripheren Rinderblut wurde Florisil als Adsorbens zur Trennung der an Protein gebundenen von den freien Steroiden eingesetzt und nach einem genau einzuhaltenden Zeitplan den Proben zugesetzt.

Im Verlauf der eigenen Untersuchungen zeigte das Florisil immer schlechter werdende Adsorptionseigenschaften. Diese Verschlechterung konnte auch durch wiederholtes Waschen und Erhitzen nicht ausgeglichen werden. Auch andere Florisilchargen erwiesen sich als nicht geeignet. Das Adsorptionsvermögen des Florisils hatte sich schließlich so vermindert, daß nur noch 5o % des freien vorgelegten ^{3}H-Corticosterons gebunden wurden. Schließlich mußte auf ein neues Adsorbens ausgewichen werden. Für die kompetitive Protein-Bindungsreaktion bieten sich neben Florisil noch eine Anzahl anderer Adsorbentien an (siehe Kap. 3.3.2.1.).

Da parallel zu diesen Versuchen im Labor bei der Östrogenbestimmung mit einem Radioimmunotest, mit Dextran beschichtete Holzkohle erfolgreich zur Anwendung kam, bot sich dieses Verfahren auch für die Progesteronbestimmung an.
Es zeigte sich jedoch, daß die zur Bestimmung von Östrogenen verwendete Kohlensuspension (o,5 % Holzkohle Norit A/ o,o5 % Dextran in Phosphatpuffer, pH 7,2) wohl aufgrund des andersartigen Bindungsproteins (keine Immunkörper, sondern Transcortin von Hund und Mensch) nicht direkt auf die Progesteron-Bestimmung übertragen werden konnte. So traten bei der Herstellung von Standardkurven, direkt abhängig von der Konzentration der Kohlensuspension, besonders bei niedrigen Progesteronkonzentrationen (bis 1,6 ng), erhebliche Adsorptionsunterschiede auf. Die scheinbare Bindung von 93oo cpm ^{3}H-Corticosteron in einer 3%igen Hundeplasmalösung stieg von ca. 24 %, bei Verwendung einer o,5 %igen Holzkohlensuspension (o,o5 % Dextran) in Phosphatpuffer, auf ca. 48 % bei Erniedrigung der Konzentrationen auf o,125 % Holzkohle (o,o125 % Dextran) an (siehe Tab.5). Ein weiteres Phänomen bei der Verwendung von Holzkohle in den Konzentrationen von o,5 - o,2 % war die Tatsache, daß nach Abzentrifugation die Zahl der Impulse im Oberstand bei den unteren Progesteronwerten (bis 1,6 ng) schon im Verlauf kurzer Zeit wieder anstieg.

Diese Beobachtungen wurden auch mit Humanplasma als Transcortinquelle gemacht, das in Konzentrationen von o,5 - 1 % für die Protein-Bindungsreaktion angesetzt wurde. Nach weiteren Versuchen erwies sich schließlich eine Kohlensuspension von o,1 % Holzkohle Norit A / o,o2 % Dextran als geeignet. Parallel angesetzte Standardkurven zeigten eine gute Übereinstimmung, sofern nach dem Abzentrifugieren der zeitliche Abstand zwischen dem Abhebern der Oberstände nicht mehr als 3o Minuten überschritt. Danach stellte sich der ursprünglich erwartete Effekt der weiteren Adsorption von Impulsen aus dem Oberstand durch die Holzkohle ein.

In unseren Versuchen konnten bei jedem Versuchsansatz 48 Proben (dies

Tab. 5

Beeinflußung der Progesteron-Standardkurve durch Verwendung unterschiedlicher Kohlensuspensionen

	% Bindung (Absolutwerte)					
	Susp. 1		Susp. 2		Susp. 3	
ng Prog.	t 0	t 3o	t 0	t 3o	t 0	t 3o
0	23,9	3o,8	33,1	36,8	47,3	47,9
o,4	21,3	23,9	29,2	-	37,4	37,9
o,8	18,6	2o,o	25,2	26,7	34,6	32,9
1,6	14,3	14,2	18,o	19,o	25,5	24,8

Susp. 1 : o,5 % Ko + o,o5 % Dextran
Susp. 2 : o,25 % Ko + o,o25 % Dextran
Susp. 3 : o,125 % Ko + o,o125 % Dextran

entsprach der Kapazität der Kühlzentrifuge), siehe auch Kap. 3.4.2.2.2., in ca. 2o Minuten gewissenhaft abgehebert werden, so daß die oben beschriebene Ungenauigkeit nicht in Erscheinung trat. Eine Verbesserung erbrachte schließlich noch die Einführung einer halbautomatischen Portionsspritze, durch die die Zeitdauer der Zugabe der Kohlensuspension erheb-

lich verkürzt wurde. Dadurch konnte bei den zur quantitativen Progesteron-Messung notwendigen Standardkurven eine noch bessere Obereinstimmung erreicht werden.

3.4.2.1.3. Anwendung eines Extraktionsganges mit bzw. ohne dünnschichtchromatographischer Isolierung von Progesteron

Nach Extraktion des Progesterons mit Petroläther aus Rinderplasma, erschien es bisher erforderlich (HOFFMANN und KARG, 1969/197o), die Progesteronfraktion von mitextrahierten Verunreinigungen und weiteren, die Protein-Bindungsreaktion beeinflussenden Steroiden, zu reinigen. Dies geschah dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten im Lösungsmittelsystem Äther : Benzol = 2 : 1 (NEILL et al., 1967). Diese chromatographische Isolierung von Progesteron in diesem System wird durch die Tab. 6 dargestellten RF-Werte, verdeutlicht.

Tab. 6

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Steroiden (Kieselgel/Benzol:Äther=1:2)[x])

Steroide	RF-Werte
Corticosteron	o,o8
Testosteron	o,33
17 - Hydroxy-Progesteron	o,38
2oß-Hydroxy-Progesteron	o,39
Progesteron	o,57

[x]) entnommen aus MÄRZ 1971

Bei der Durchführung dieser chromatographischen Auftrennung, werden die Dünnschichtplatten in 5 gleichgroße Lauflinien (1-5) unterteilt. Der niedergetrocknete biologische Extrakt wird in 8 Tropfen Chloroform aufgenommen, mit einem whirlmix ca. 1o Sekunden geschüttelt und, nachdem man die Probe 1 Minute stehen ließ, auf die Lauflinie 2 oder 4, in 5 nebeneinanderliegenden Punkten, 2,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt, aufgetragen. Dieser Vorgang wird mit nochmals 8 bzw. 4 Tropfen Chloroform wiederholt. Auf die angrenzenden Lauflinien 1,3 und 5 wird in gleicher Höhe eine Mischung von je 15 µg Progesteron und 17α - OH-Progesteron aufgetragen. Nach Entwicklung der Platte wird die Progesteronzone durch den links und rechts mitlaufenden Progesteronstandard lokalisiert. Die Trennung vom mitaufgetragenen 17α-OH-Progesteron dient zur Beurteilung des chromatographischen Reinigungs- und Trennungseffektes.

Nach Markierung der Progesteronzone wird das Kieselgel mittels der in Kap. 3.4.1. beschriebenen Pasteurpipette abgesaugt. Das Progesteron wird dann, nach Füllung der Pipette mit ca. 2 ml Methanol, direkt in ein konisches 15-ml-Zentrifugenglas eluiert. Anschließend wird das Eluat unter Stickstoff bei 4o ^{o}C niedergetrocknet. Nach Zugabe von 2 ml H_2O bidest, wird Progesteron mit zweimal 2 ml Petroläther rückextrahiert, wobei die Probe jeweils 1o Sekunden an einem whirl-mix geschüttelt wird. Durch diese Lösungsmittelverteilung gelang es, hydrophile Verunreinigungen, die wahrscheinlich von der Dünnschichtplatte stammten, abzutrennen. Unterblieb dieser Reaktionsschritt, so ergab die Protein-Bindungsreaktion meist keine vernünftig auswertbaren Ergebnisse.

Die in einem Einweg-Reaktionsglas für die Protein-Bindungsreaktion gepoolten Petroläther-Extrakte werden nun im Stickstoffstrom bei 4o ^{o}C niedergetrocknet. Der Extrakt wird anschließend in genau 1 ml Methanol gelöst und, wie in Kap. 3.4.2.2.2. beschrieben, weiterverarbeitet.

Diese dünnschichtchromatographische Reinigung des Petrolätherextraktes erfordert einen erheblichen Aufwand an Zeit und Meterial, zudem treten dabei wiederholt Aufarbeitungsverluste in größerem Umfange auf. Ferner kam es trotz der oben beschriebenen Lösungsmittelverteilung zwischen H_2O bidest und Petroläther wiederholt vor, daß - wahrscheinlich auf Grund immer noch vorhandener Störsubstanzen von der Dünnschichtplatte - ganze Versuchsreihen wiederholt werden mußten.

Um diese allgemein bekannten Nachteile der Dünnschichtchromatographie REEVES et al., 197o; DOERR, 1971) für die Protein-Bindungsreaktion zu umgehen, wurden zahlreiche andere chromatographische Reinigungsschritte, wie Papierchromatographie oder chromatographische Auftrennung auf Celite- oder Sephadex LH 2o-Säulen (MAEDA et al., 1969, ABRAHAM et al., 197o, MIKHAIL et al.,197o) beschrieben. Für die Routinemessung am geeignetsten ist jedoch der von JOHANSSON (1969) beschriebene Weg. Er konnte zeigen, daß bei Verwendung eines bestimmten Petroläthers und unter Weglassung des dünnschichtchromatographischen Reinigungsschrittes, Progesteron während des Zyklus der Frau spezifisch erfaßt werden konnte.

Es wurde nun versucht, dieses Verfahren auch auf das Rinderblut zu übertragen. Nach Angaben von MURPHY (1967) und JOHANSSON (1969) werden durch Petroläther nur Progesteron, 2oα- und 2oß-OH-Progesteron, sowie 17α-OH-Progesteron und Testosteron quantitativ extrahiert. In eigenen Extraktionsversuchen mit Petroläther konnte gezeigt werden, daß radioaktiv markiertes Progesteron und 17α-OH-Progesteron zu 85 - 9o % bzw. nur zu 3o - 4o % wiedergefunden wurden. Bei einer stets gleichbleibenden Extraktionsausbeute für Progesteron, ergaben sich bei anderen Steroiden starke Schwankungen, abhängig von der jeweiligen Petroläther-Charge.

Hiervon ausgehend, sowie bei Berücksichtigun der Tatsache, daß 17α-OH-Progesteron in nur kaum nachweisbaren Mengen im peripheren Rinderblut vorkommt (pers. Mitteilung Dr. R. Stupnicki, Warschau), erschien

es praktisch, ein entsprechendes Verfahren ohne dünnschichtchromatographische Reinigung auch für die Progesteronbestimmung beim Rind anzuwenden. Dieses Verfahren wurde anfänglich einer intensiven Oberprüfung unterworfen. Dazu wurde in Parallelversuchen, die Progesteronbestimmung, sowohl mit der beschriebenen dünnschichtchromatographischen Reinigung, als auch ohne diesen Reinigungsschritt, d.h. nur nach der Petroläther-Extraktion, durchgeführt.
In Tab. 7 sind die Mittelwerte von 12 Doppelbestimmungen angeführt.

Tab. 7

Gegenüberstellung der Ergebnisse mit und ohne dünnschichtchromatographische Reinigung

ng Progesteron / ml Plasma		
mit DC.	ohne DC.	Diff. der Werte
0,20	0,20	-
0,27	0,45	0,18
0,49	0,23	0,26
0,53	0,48	0,05
0,56	0,97	0,41
1,20	0,88	0,32
3,10	2,33	0,77
3,99	4,13	0,14
4,70	3,92	0,78
5,04	4,17	0,87
7,60	7,92	0,32
9,65	9,56	0,09

Aus der Tabelle ergibt sich bei Vergleich der Werte beider Bestimmungsverfahren einmal eine Übereinstimmung, siebenmal liegen die Werte " mit DC " höher, während viermal die Werte " ohne DC " höher liegen. Für die mittlere Standardabweichung der Differenzwerte wurden ± o,28 ng Progesteron / ml Plasma errechnet.

3.4.2.2. Beschreibung des Arbeitsganges

Wie bereits in Kap. 3.4.2.1.1. beschrieben, wurden Plasmen verschiedener Spezies und Spender, nach den dort aufgezeigten Verfahren , untersucht. Dabei hat sich das Plasma einer Frau, die täglich o,o5o mg Äthynil-Östradiol und (o,25 mg D-13-Äthyl - 17∝- äthinyl - 13ß - hydroxy-4- gonen- 3 - on)zur Ovulationshemmung einnahm, als am geeignetsten erwiesen. Von diesem, mit Holzkohle von endogenen Steroiden gereinigten Humanplasma, wurde eine o,5 %-ige Verdünnung in Phosphatpuffer angesetzt, leicht geschüttelt, auf 4 °C gekühlt und unmittelbar anschließend für die Protein-Bindungsreaktion verwendet.

Die"Vorlage" wurde wie folgt angesetzt:
39,o ng ^{3}H-Corticosteron, gelöst in 3oo µl Äthanol/Benzol (1:1), werden in einem Erlenmeyerkolben im Stickstoffstrom bei 4o °C niedergetrocknet und in 2o ml Phosphatpuffer aufgenommen. Um eine vollständige Lösung des ^{3}H-Corticosterons zu erreichen, wird der Ansatz ca. 2o Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und während dieser Zeit mehrfach geschüttelt. Nach Abkühlung auf 4 °C (im Eisbad) kann die Vorlage für Testzwecke verwendet werden. Wird sie im Kühlschrank bei (4 °C) aufbewahrt, so kann sie ohne feststellbare Veränderungen (z.B. Adsorption an das Glas) 2 - 3 Wochen benützt werden.

3.4.2.2.1. Extraktionsgang

Ein ml Plasma wird im Extraktionsglas (ein 15 ml Zentrifugenglas mit

Schiffstropfen) mit ca. 2ooo dpm ^{3}H-Progesteron, gelöst in 15o µl Phosphatpuffer, als interner Standard, versetzt. Die Probe wird gut geschüttelt und ca. 5 Minuten in ein Wasserbad von 37 °C gestellt, um eine gleichmäßige Verteilung des endogenen mit dem exogen zugeführten Progesteron zu erreichen. Anschließend wird dreimal mit 2 ml Petroläther extrahiert. Hierzu wird jede Probe genau eine halbe Minute gut geschüttelt; die Petrolätherüberstände, in denen sich ja das Progesteron befindet, werden in einem Einweg-Reaktionsglas gepoolt und dann im Stickstoffstrom bei max. 4o °C niedergetrocknet.
Zu dem niedergetrockneten Extrakt wird genau 1 ml Methanol zugegeben und 1o Sekunden am whirl-mix geschüttelt. Danach werden o,2 ml zur Berechnung der Wiederauffindung (siehe Kap. 3.4.2.2.3.) entnommen, der Rest der Probe wird für die Protein-Bindungsreaktion verwendet.

3.4.2.2.2. Durchführung der Protein-Bindungsreaktion (" Test ")

Nach Entnahme des aliquoten Teils zur Berechnung der Wiederauffindung, werden die Restproben im Stickstoffstrom (4o °C) niedergetrocknet und in o,1 ml Phosphatpuffer gelöst. Dann wird den Proben zunächst o,1 ml der ^{3}H-Corticosteron-Vorlage und darauf folgend o,5 ml der Transcortinlösung zugegeben. Die so vorbereiteten Proben werden gemeinsam im Reagenzglasgestell kurz geschüttelt, für 7 Minuten in einem Wasserbad von 37 °C inkubiert, dann nochmals eine Minute geschüttelt und für weitere 7 Minuten in das Wasserbad zurückgestellt. Nach erneutem Durchmischen verbleiben die Proben 1 Stunde im Eisbad; danach werden zur Trennung der freien von den an Protein gebundenen Steroiden, o,5 ml einer auf 4 °C gekühlten Kohlensuspension (siehe Kap. 3.4.2.1.2.) zugegeben. Die Proben werden dann eine Minute - wiederum " en bloc " im Gestell - gut geschüttelt, nochmals für 1o Minuten im Eisbad belassen und anschließend 15 Minuten lang in einer Kühlzentrifuge bei ca.2ooo RPM und 4 °C zentrifugiert; die Kohle

bildet einen gut abgegrenzten Bodensatz.

Vom Oberstand, in dem sich die an Protein gebundenen Steroide (Progesteron und ^{3}H-Corticosteron) befinden, wird schließlich 1 ml abgehebert und zur Bestimmung der Radioaktivität in eine Zählkuvette verbracht, der 1o ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben werden.

Bedingt durch die Kapazität der Kühlzentrifuge, konnte die Protein-Bindungsreaktion mit jeweils 48 Proben durchgeführt werden. Diese Probenzahl setzt sich zusammen aus 32 biologischen Proben und jeweils 8 Progesteronwerten der beiden Standardkurven. (siehe Kap. 3.4.2.2.3.). Da die für die Standardkurve verwendeten Progesteronkonzentrationen bereits in o,1 ml Phosphatpuffer gelöst waren, entfällt bei den Ansätzen der Standardkurve die zu Anfang dieses Kapitels beschriebene Zugabe von o,1 ml Phosphatpuffer.

Alle anderen sich anschließenden Verfahrensschritte werden von allen 48 Proben gemeinsam durchlaufen. Dabei wird zum Ausgleich eventueller, zeitlich bedingter Gleichgewichtsverschiebungen während der Protein-Bindungsreaktion, eine ganz bestimmte Reihenfolge in der Handhabung der Proben eingehalten. Diese Reihenfolge besteht aus 8 Proben der ersten Standardkurve, 32 biologischen Proben und 8 Proben der zweiten Standardkurve. Bei der Auswertung des " Tests " werden dann die Mittelwerte dieser beiden Standardkurven zur Bestimmung der Progesteronmenge in den biologischen Proben herangezogen.

3.4.2.2.3. Auswertung der Protein-Bindungsreaktion

Zur Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Proben wurden als Szintillator 1o ml (Bray's Solution) zugegeben (siehe Kap. 3.4.1.). Diesem Szintillator konnten ohne nennenswerte Beeinflußung der Zählausbeute sowohl die o,2 ml Methanol zur Berechnung der Wiederfindung (siehe Kap. 3.4.2.2.1.), als auch die wässerigen 1,o ml aus dem Ober-

stand der Protein-Bindungsreaktion (siehe Kap. 3.4.2.2.2.) zugegeben werden. Für die Messung selbst standen die Flüssigkeitsszintillationszähler: Modell 332o Packard Instruments und Modell CM 2oo Corumatik der Fa. ICN Tracerlab zur Verfügung. Bei beiden Geräten war ein Kanal auf eine optimale Tritium-Zählausbeute eingestellt, die konstant bei 4o %, bzw. 56 % lag. Da eine Probeserie (inklusive Standardkurve) immer an einem Gerät gezählt wurde, konnte auf eine Umrechnung auf die tatsächlich vorhandene Zerfallsrate " dpm " (disintegration per minute), durch Berücksichtigung des Faktors " Zählausbeute ", verzichtet werden. Alle Berechnungen wurden daher mit den tatsächlich gemessenen Impulsen " cpm " (counts per minute) durchgeführt.

Zur genauen Berechnung der Wiederauffindung wurde den Proben wie in Kap. 3.4.2.2.1. angegeben, eine kleine Menge von ^{3}H-Progesteron (ca. 7,o pg ≙ 2ooo dpm) von hoher spezifischer Aktivität (41 Ci/mM) als interner Standard vor der Extraktion zugegeben.

Gleichzeitig wurde dieselbe Menge ^{3}H-Progesteron in eine Zählkuvette pipettiert und bis zu ihrer Verwendung als Bezugswert (loo %) bei Berechnung der Wiederauffindung im Kühlschrank (4 ^{o}C) aufbewahrt. Der vor der Protein-Bindungsreaktion entnommene aliquote Teil von o,2 ml wird gemeinsam mit dem loo % Bezugswert viermal 5 Minuten lang gezählt, der Mittelwert berechnet und der Geräte-Background abgezogen. Nach Multiplikation dieses Wertes mit dem Faktor 4 erhält man die in der Restprobe vorhandenen Impulse die ja für die Protein-Bindungsreaktion verwendet wurden. Nach Bezugnahme auf den anfangs zugesetzten internen Standard mit bekannter Impulsmenge (loo % Wert) läßt sich die Wiederfindung nach folgender Formel berechnen.

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{\text{Noch vorhandene Menge cpm int. Std. x loo}}{\text{ursprünglich zugegebene Menge cpm int.Std.}}$$

Die Berechnung, der in den einzelnen Proben vorhandenen Progesteronmenge,

erfolgte über die aus den 2 Standardkurven errechneten Mittelwerte, die bei jeder Versuchsreihe (siehe Kap. 3.4.2.2.2.) aufgestellt wurden. Die vorgegebenen Konzentrationen lagen, wie in Abb. 8 gezeigt, zwischen 0 und 8,0 ng Progesteron (0,0; 0,2 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0; 4,0 ; 6,0 und 8,0 ng). Zum Ausgleich des Meßfehlers, der durch die Zugabe des internen Standards (ca. 2000 dpm/7,0 pg Prog.) zu den biologischen Proben entsteht, wurde anfänglich den Eichpunkten der Standardkurven 2/3 dieses internen Standards zugesetzt (HOFFMANN und KARG, 1971). Dieser Faktor ergab sich aus der allgemeinen Wiederauffindungsrate von 60 - 70 %. Im Verlaufe der Untersuchungen hatte sich jedoch gezeigt, daß dieser Ausgleich unterlassen werden konnte, da die in den biologischen Proben noch vorhandenen Impulsmengen des radioaktiven internen Standards im Vergleich zu der hohen Impulsmenge der radioaktiven Corticosteron - Vorlage nicht weiter in Erscheinung traten. Auch bei Gegenüberstellung der tatsächlichen Progesteronmenge des internen Standards (7,0 pg) und der Größenordnung, in der sich die Progesteronwerte der biologischen Proben bewegen, (0,3 - 12,8 ng) zeigt sich der Wegfall des oben beschriebenen Ausgleichs als gerechtfertigt.

Bei der graphischen Darstellung der Standardkurve wurden auf der Abszisse ng-Progesteron und auf der Ordinate die gefundenen cpm aufgetragen.

Jede Probe wurde zweimal 5 Minuten lang im Szintillationszähler gezählt; nach Berechnung der mittleren cpm-Zahl konnte die in die Protein-Bindungsreaktion eingegangene Progesteronmenge direkt aus der Standardkurve in ng abgelesen werden. Dieser Wert wurde dann mit dem entsprechendem Wiederauffindungsfaktor korrigiert und die Konzentration in ng Progesteron / ml Plasma angegeben.

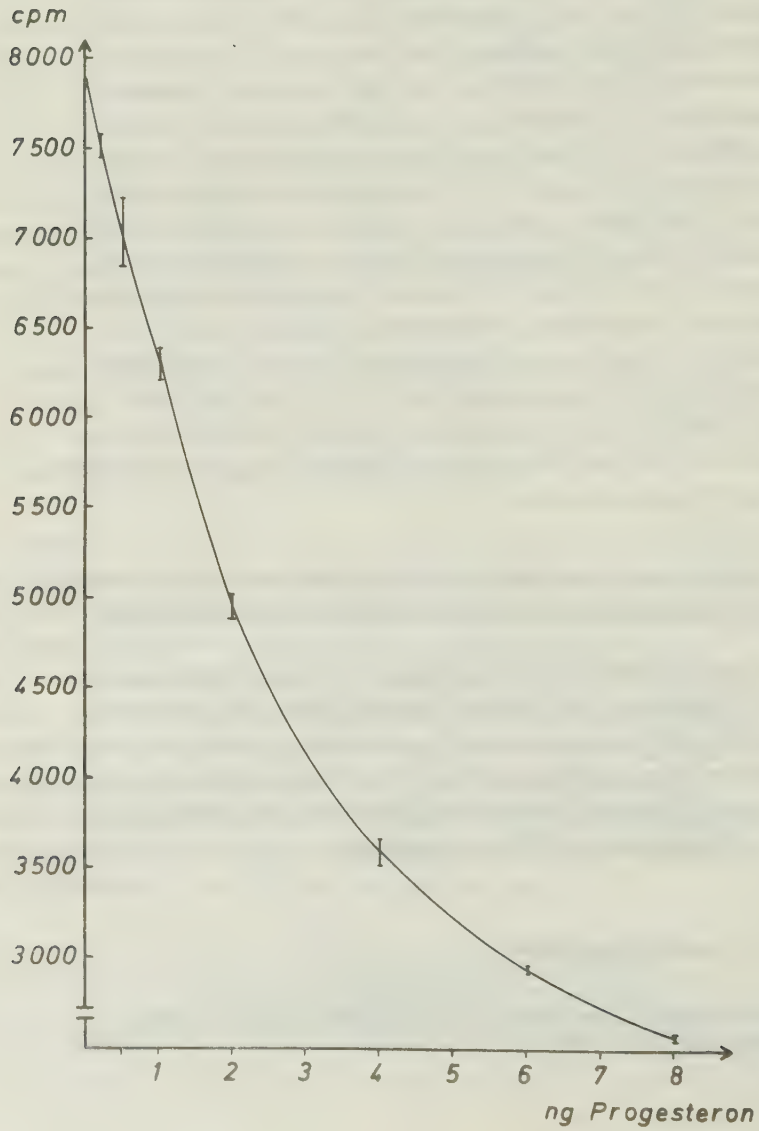
3.4.2.2.4. Beurteilungskriterien

Die Empfindlichkeit einer Methode ist definiert, als die kleinste

Abb. 8

Progesteron - Standardkurve

Humanplasma (0,5% im Ansatz)



Menge, die sich noch von Null unterscheiden läßt. Dieser Wert lag, wie aus der Standardkurve zu erkennen ist, bei o,2 ng. Da sich aus der routinemäßigen Oberprüfung des Reagentienleerwertes bei 36 Doppelbestimmungen ein Mittelwert von o,o7 ng ergab, lag für die angewandte Methode die untere Grenze der Meßgenauigkeit bei ca. o,3 ng/ml.

(Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen betrug der mittlere Reagentienwert von 12 Doppelbestimmungen bei Anwendung des dünnschichtchromatographischen Reinigungsverfahrens o,26 ng).

Tab. 8

Beispiele von Zusatzversuchen mit " kalten " Progesteron

zugesetzte Prog.-Menge in ng	Probenanzahl	Mittelwert der wiedergef. Prog.-Menge in ng	Standardabweichung in ng
2,o	5	1,84	± o,2o
4,o	1o	4,o7	± o,44
6,o	5	5,5o	± o,3o
8,o	1o	7,68	± o,69

Neben der routinemäßigen Ermittlung des Reagentienleerwertes, wurde die Genauigkeit der Methode regelmäßig und parallelaufend mit biologischen Bestimmungen, durch Ermittlung der Wiederfindung von nicht

markiertem Progesteron (2,o ; 4,o ; 6,o ; 8,o ng Progesteron), das 1 ml Bullenplasma zugesetzt wurde, überprüft. Als Beispiel sind in Tab. 8 die Ergebnisse der Wiederfindung (Mittelwerte und Standardabweichungen) von 5 Plasmaproben, denen je 2,o bzw. 6,o ng Progesteron und von 1o Plasmaproben, denen je 4,o und 8,o ng Progesteron zugesetzt wurden, dargestellt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, ergibt sich ein Durchschnittsfehler von 9,12 % (± 2,6%). Zeigte das Ergebnis dieser im Doppelansatz mitlaufenden Wiederfindungsversuche eine Abweichung von mehr als 15 %, so wurde die ganze Versuchsreihe wiederholt. Dies war allerdings nur in sehr seltenen Fällen notwendig.

Tab. 9

Vergleich der Progesteronmeßwerte bei Extraktion von 1,o bzw. o,5 ml Plasma (Mittelwert der Doppelbestimmung)

Plasmaprobe K4	Extraktion aus 1,o ml Plasma ng Prog./ml Pl.	Extraktion aus o,5 ml Plasma ng Prog./ ml Pl.
17.2.71 - $2o^{oo}$	3,4o	3,1o
17.2.71 - 24^{oo}	2,95	2,45
18.2.71 - 4^{oo}	2,6o	2,6o
18.2.71 - 7^{oo}	2,6o	2,35
18.2.71 - 8^{3o}	3,3o	3,o5
18.2.71 - $1o^{oo}$	3,8o	3,65

Die Extraktion unterschiedlicher Plasmavolumina ist ebenfalls ein Maß für die Genauigkeit der Methode. Bei Kalbin 4 wurden in einer Versuchsreihe 1,o ml Plasma und o,5 ml Plasma extrahiert. Dabei erwies sich, daß die auf ng/ml Plasma berechneten Progesteronwerte gut übereinstimmten, wie am Beispiel von 6 Proben in Tab. 9 gezeigt wird.

Die gute Reproduzierbarkeit der Methode ergibt sich aus wiederholten Untersuchungen von Plasmaproben zu verschiedenen Zeitpunkten. In Tab. 1o sind der Ergebnisse einiger Wiederholungsmessungen mit Angabe des zeitlichen Abstandes der jeweiligen Bestimmungen aufgeführt.

Tab. 1o

Ergebnisse bei Wiederholung der Progesteronbestimmung

Versuchstier	Plasmaprobe	ng Prog. / ml Plasma						zeitl. Abstand
		1. Messung			Wiederholung			
		Wert 1	Wert 2	MW	Wert 1	Wert 2	MW	Wochen
K 6	2o.1.71 - 8^{00}	8,1o	7,9o	8,o	7,9o	7,6o	7,75	3
	9.2.71 - 4^{00}	6,1o	6,4o	6,25	6,3o	6,3o	6,o	3
KRo	15.2.71 -18^{00}	1,9o	2,2o	2,o5	2,1o	2,o	2,o5	7
	22.2.71 - 8^{00}	5,5o	5,3o	5,4o	5,6o	-	-	7
K 4	31.1.71 - 8^{00}	3,3o	3,2o	3,25	2,9o	3,1o	3,o	1o
	18.2.71 -$2o^{00}$	1,6o	1,45	1,55	1,4o	1,45	1,4o	1o
	24.1.71 - 8^{00}	7,2o	7,6o	7,4o	6,9o	7,4o	7,15	1o
	24.1.71 - 8^{00}				7,3o	7,7o	7,o	14

Die Ergebnisse der Mehrfachbestimmungen zeigen gut Obereinstimmungen, wobei die durchschnittliche Abweichung der Mittelwerte 2,22 % beträgt.

Auf die Spezifität der Protein-Bindungsreaktion zur Messung von Progesteron im peripheren Rinderblut wurde bereits von HOFFMANN und KARG (197o) eingegangen, die beim direkten Vergleich mit einem gaschromatographischen Verfahren gleiche Werte erzielten. Die in den vorliegenden Untersuchungen gemessenen Progesteronkonzentrationen liegen im selben Größenbereich und stimmen mit Werten von anderen Autoren überein, die Progesteron gaschromatographisch bestimmten (ARMSTRONG und BLACK, 1966; SCHOMBERG et al., 1967; SHEMESH et al., 1968; POPE et al., 1969; STABENFELDT et al., 1969) oder mit Protein-Bindungsverfahren bei dünnschichtchromatographischer (HOFFMANN und KARG, 1969/197o) oder säulenchromatographischer (AL_2O_3) (DONALDSON et al., 197o) Isolierung von Progesteron, gemessen haben. Weiterhin konnte die Spezifität der Methode durch Parallelversuche objektiviert werden, in denen Progesteron mit der Protein-Bindungsreaktion, sowohl unter Verwendung von Humanplasma als Transcortinquelle, als auch mit spezifischen Antikörpern als Bindungsprotein (siehe Kap. 3.4.3) bestimmt wurde. In Tab. 11 sind die Mittelwerte von 1o Parallelbestimmungen einander gegenüber gestellt.

3.4.3. Verfahren bei Verwendung von Antikörpern als Bindungsprotein

In Kap. 3.3.2.3. wurde darauf hingewiesen, daß spezifisches Progesteron-Antiserum, mit einer nur geringen Kreuzreaktion mit 17∝-OH-Progesteron, freundlicherweise von Dr. B. Furr, Reading, England, zur Verfügung gestellt wurde. Inzwischen ist auch im eigenen Labor die Herstellung von Progesteron-Antiserum mittels Progesteron-hemisuccinat-RSA als Antigen nach Immunisierungsversuchen bei Kaninchen gelungen.

Im Gegensatz zu dem, bei Verwendung von Plasmaproteinen bei Protein-Bindungsreaktion eingesetzten ^{3}H-Corticosteron, muß natürlicherweise bei Anwendung von Progesteron-Antiserum, aufgrund der Spezifität der Antikörper, ^{3}H-Progesteron als Vorlage zugesetzt werden.

Tab. 11

Vergleich der Ergebnisse bei Einsatz von Humantranscortin und spezifischen Antikörpern als Bindungsprotein

Plasmaprobe	Bindungsprotein	
	Transcortin ng/ml Plasma	spez. Antikörper ng/ml Plasma
K 5 3.1.71	< 0,30	< 0,40
4.1.71	< 0,30	< 0,40
5.1.71	1,05	1,10
6.1.71	2,20	2,20
7.1.71	3,60	3,20
12.1.71	7,75	8,25
18.2.71	0,65	0,85
19.2.71 - 8^{00}	1,40	1,85
21.2.71 - 8^{00}	3,05	2,70
22.2.71 - 9^{00}	3,40	3,15

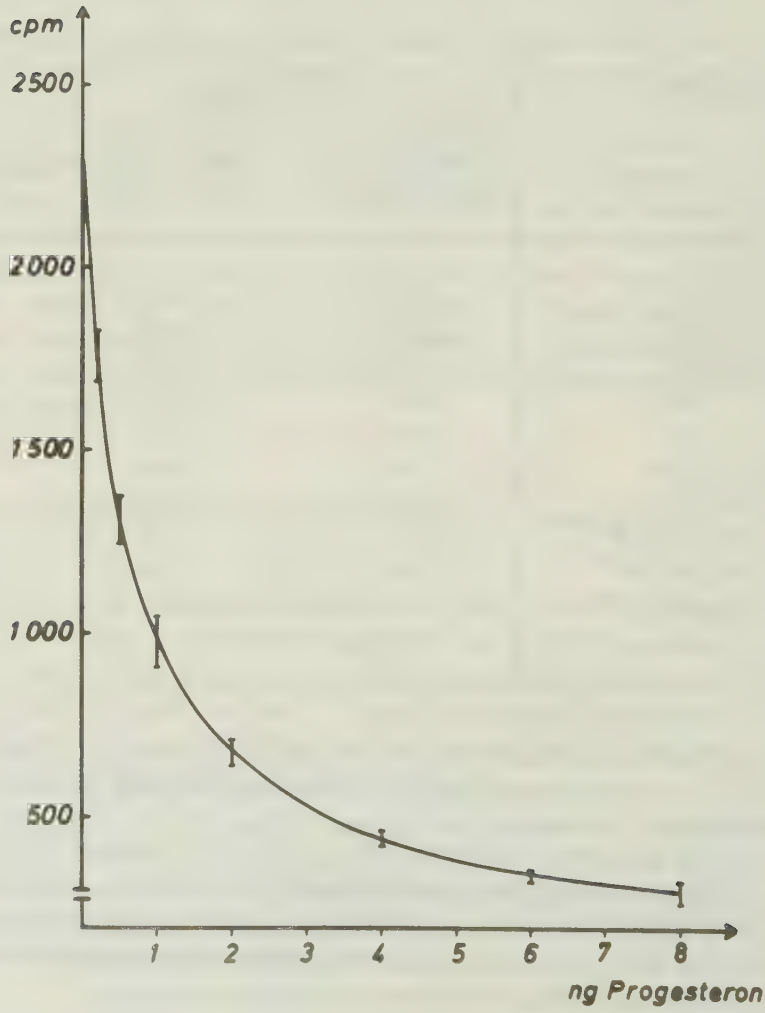
Zur Ermittlung der Bindungskapazität des Antiserum, wurde das in Kap. 3.4.2.1.1.1. beschriebene Verfahren herangezogen, wobei den Antiserum-Verdünnungen, sie bewegten sich zwischen 1: 20 und 1: 1 600, jeweils 70,0 pg (≙ 20 000 dpm) ^{3}H-Progesteron, gelöst in 0,1 ml Puffer, zugegeben wurden. Für Meßzwecke wurde schließlich als eine geeignete Antiserum-Verdünnung ein Ansatz von 1 : 1 000 ermittelt, die entsprechend wie die in Kap. 3.4.2.2. beschriebene Transcortinlösung angesetzt wird, jedoch ohne das Antiserum vorher mit Holzkohle zu behandeln.

Im eigentlichen Verfahren zur Progesteronmessung wurde auf die interne

Abb. 9

Progesteron - Standardkurve

Antiserum (0,1 % im Ansatz)



Standardisierung und alle weiteren damit zusammenhängenden Versuchsschritte verzichtet, da sich in Kontrollversuchen mit ^{3}H-Progesteron eine durchschnittliche Wiederfindung von 91 % ergab.

Beim Extraktionsgang kommt aber noch ein zusätzlicher Reinigungsschritt hinzu, d.h. die gepoolten Petrolätherüberstände aus der Plasmaextraktion (in denen sich das Progesteron befindet) werden in 15 ml Zentrifugengläsern im Stickstoffstrom bei 4o ^{o}C niedergetrocknet und dann in 1,o ml Aqua bidest aufgenommen. Aus dieser wässerigen Lösung wird das Progesteron mit 2,o ml Äther pro narcosi zweimal rückextrahiert, wobei jede Probe jeweils 1o Sekunden auf einem Whirl-mix geschüttelt wird. Dadurch werden Plasmareste, die bei der Petrolätherextraktion möglicherweise mit abgehebert wurden, vom Progesteron getrennt. Die Ätherüberstände, in denen das Progesteron nun gelöst ist, werden in Einweg-Reaktionsgläsern gepoolt und dann wiederum im Stickstoffstrom bei 4o ^{o}C niedergetrocknet.
Bei Berücksichtigung dieser Modifikationen ist dann das angewandte Meßverfahren dasselbe, wie es in Kap. 3.4.2.2.1. bis 3.4.2.2.3. beschrieben wird. Eine der zur Berechnung der in den einzelnen Proben vorhandenen Progesteronmenge erforderlichen Standardkurven, ist in Abb. 9 als Beispiel wiedergegeben.

Zur Beurteilung dieser Methode wurden die gleichen Kriterien herangezogen, wie schon in Kap. 3.4.2.2.4. beschrieben. Die Empfindlichkeit des Verfahrens ergibt sich durch den, in der Standardkurve noch signifikanten von Null unterscheidbaren Wert von o,2 ng. Addiert man diesen Wert, mit dem mittleren Reagentienleerwert von o,19 ng ($\pm$ o,o9 ng), der bei 19 Bestimmungen ermittelt wurde, so liegt die untere Grenze der Meßgenauigkeit bei ca. o,4 ng/ml Plasma. Die Genauigkeit der Methode wurde durch die Wiederauffindung bekannter Progesteronmengen (4,o und 8,o ng Prog), die 1,o ml Bullenplasma zugesetzt wurden, überprüft. Bei 11 Doppelbestimmungen wurden von 4,o ng zugesetztem Progesteron durchschnittlich 4,oo4 ng bei einer Standardabweichung von $\pm$ o,388 ng und von 8,o ng zugesetzem Progesteron, durchschnittlich 7,937 ng ($\pm$ o,37o ng) wiedergefunden. Dabei lagen die sehr guten Variationskoeffizienten bei $\pm$ 9,7 % bzw. $\pm$ 4,7 %.
Durch Wiederholungsmessungen von Plasmaproben, bei denen Progesteron schon

einmal mit Hilfe der kompetitiven Protein-Bindungsreaktion unter Verwendung von Hundeplasma als Bindungsprotein und dünnschichtchromatographischer Isolierung von Progesteron, bestimmt wurde (MÄRZ, 1971), konnte die Spezifität der vorliegenden Methode nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Vergleichsmessung sind in Tab. 12 wiedergegeben.

Tab. 12

Vergleich der radioimmunologisch gemessenen Progesteronwerte, mit Ergebnissen, die von MÄRZ (1971) bei denselben Plasmaproben ermittelt wurden (Mittelwerte der Doppelbestimmungen)

Plasmaprobe (Trächtigkeits-Tag)	Methode			
	RIT ng/ml Plasma	CPBR (MÄRZ 1971) ng/ml Plasma	MW ng	Diff. ng
Kuh P.269.	4,28	5,o5	4,67	o,39o
" 271.	5,26	5,1o	5,18	o,o8o
" 272.	5,76	4,95	5,355	o,4o5
" 273.	o,88	o,95	o,915	o,o35
" 274.(Geb.)	o,52	o,3o	o,41o	o,11o
" 1.Tag.p.p.	o,48	o,65	o,565	o,o85
" 2.Tag.p.p.	o,8o	o,8o	o,8o	o,ooo
Kuh A.27o.	5,21	6,9o	6,o55	o,845
272.	6,o5	7,1o	6,575	o,525
274.	6,13	6,6o	6,365	o,235
276.	o,99	1,o5	1,o2o	o,o3o
277.	o,66	o,75	o,7o5	o,o45

Aus der Tabelle ergibt sich für die Differenzwerte ein Mittelwert von o,232 ng, bei einer Standardabweichung von ± o,258 ng

CPBR = kompetitive Protein-Bindungsreaktion

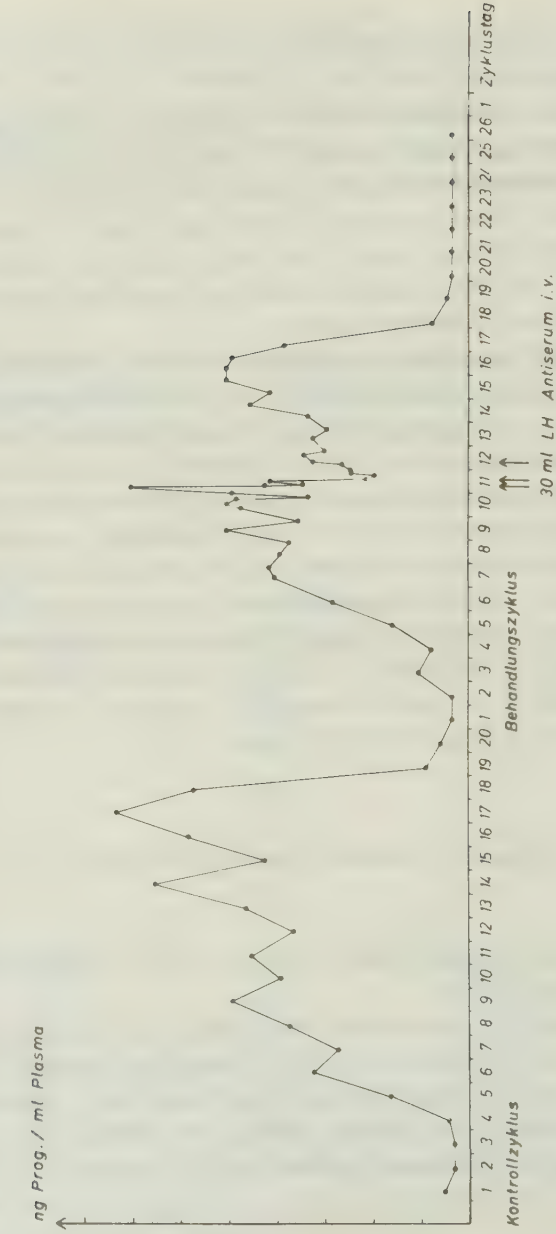
4. Ergebnisse

Wie bereits im methodischen Teil dargelegt, wurde der Progesteronspiegel im peripheren Blut bei 2 Kühen und 3 Kalbinnen während zwei aufeinanderfolgenden Zyklen bestimmt. Der erste dieser beiden Zyklen diente als " Kontrollzyklus "; im zweiten Zyklus (" Behandlungszyklus") wurden die Antisera gegen LH bzw. Prolaktin an den Tagen 11 und 12 verabreicht und deren Wirkung an Hand des Progesteronspiegels und rektal ermittelter Ovarbefunde gemessen.
Die in den beiden Zyklen gemessenen Einzelwerte sind in tabellarischer und graphischer Form dargestellt. Für die Beurteilung des Ergebnisses wurden die zu gleichen Uhrzeiten (8 Uhr) im Kontroll- und Behandlungszyklus ermittelten Werte einander gegenübergestellt und die Differenz errechnet. Bei dieser Gegenüberstellung bleiben jedoch die zahlreichen Meßpunkte des Behandlungszyklus unberücksichtigt, so daß ihr nur eine begrenzte Aussagekraft zukommt. Es wurde daher weiterhin versucht, einen Maßstab für die Progesteronproduktion zu erhalten. Dazu wurde die in der graphischen Darstellung von der Progesteronverlaufskurve begrenzte Fläche planimetrisch ausgewertet. Hierbei wurden jeweils die aus der Auswertung des Gesamtzyklus, sowie die ab dem 1o. Zyklustag (8 Uhr) bis zum Zyklusende resultierenden Werte verglichen.

4.1. Ergebnisse bei Anwendung eines Anti-LH-Serums

Mit diesem Antiserum wurden die Kuh " Kafeil " und die Kalbinnen Nr. 5 und Nr. 6 behandelt.
Die Einzelwerte der Progesteronbestimmungen bei der Kuh " Kafeil " sind in Tab. 13 aufgeführt und in Abb. 1o graphisch dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, werden im Kontrollzyklus ab dem 3. Zyklustag ansteigende Progesteronwerte,die zunächst unterhalb des Meßbereiches (<o,3 ng/ml Plasma) lagen, bis zu einem Gipfelwert von 7,35 ng am 17. Tag gemessen. Ein

Abb. 1o


Progesteron - Konzentration im peripheren Blutplasma (Kuh Kafeil)
ng Prog./ ml Plasma
1
2
3
4
5
6
7
Kontrollzyklus
Behandlungszyklus
30 ml LH Antiserum i.v.
Zyklustag

drastischer Abfall von 5,75 ng am 18. Zyklustag auf o,9o ng am 19. Tag markiert das funktionelle Ende des Corpus luteum. Zu Beginn des Behandlungszyklus lagen die Werte wieder unter o,3 ng/ ml Plasma. Im Behandlungszyklus selbst steigt der Progesteronspiegel konstant bis zum 7. Tag auf 4,o ng an. Die nun bis zum Beginn des 11. Zyklustag gemessenen Werte liegen etwa im gleichen Größenbereich. Es zeigen sich aber relativ starke kurzfristige Schwankungen, die wohl aufgrund der häufigen Blutentnahmen offenkundig werden. So wurde am 11. Zyklustag ein sehr kurzfristiger Anstieg von ca. 5 ng auf 7,35 ng gemessen; nach ca.8 Stunden wurde jedoch der Ausgangswert wieder erreicht. Nach der ersten Antiserum-Verabreichung (11. Zyklustag, 8.3o Uhr) erfolgte eine Senkung des peripheren Progesteronblutspiegels auf 3,4o ng/ml Plasma innerhalb von 1,5 Stunden. Zwei Stunden nach der 2. Antiserum-Applikation (11. Zyklustag, 13.3o Uhr) wurden Tiefstwerte von 1,95 ng erreicht. Daran anschließend steigen die Progesteronwerte wieder relativ kontinuierlich bis auf 5,o ng am 16. Tag an. In ähnlicher Weise wie im Kontrollzyklus fallen die Werte dann abrupt zum 18. Tag ab und liegen am 2o. Tag bereits wieder außerhalb des Meßbereichs. Der Behandlungszyklus ist mit 25 Tagen Dauer im Vergleich zu den vorhergegangenen Zyklen auffallend verlängert (siehe Tab. 27; Seite 12o).
Die Progesteronwerte liegen auch in der Verlängerungsphase stets außerhalb des Meßbereiches.

Tab. 13

Kuh "Kafeil"

Progesteronkonzentrationen im peripheren Blutplasma

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Kontrollzyklus				
1	8.oo	o,7o	o,35	o,55

Fortsetzung Tab. 13

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Kontrollzyklus				
2	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
3	"	<o,3o	<o,3o	<o,3o
4	"	o,6o	<o,3o	o,45
5	"	1,8o	1,6o	1,7o
6	"	3,1o	3,4o	3,25
7	"	2,6o	3,oo	2,8o
8	"	3,5o	4,oo	3,75
9	"	4,95	4,9o	4,95
1o	"	3,8o	4,oo	3,9o
11	"	4,4o	4,7o	4,55
12	"	3,5o	3,8o	3,7o
13	"	4,4o	4,8o	4,6o
14	"	6,45	6,55	6,5o
15	"	4,4o	4,1o	4,25
16	"	5,85	5,85	5,85
17	"	7,3o	7,4o	7,35
18	"	5,45	6,1o	5,75
19	"	o,85	o,9o	o,9o
2o	"	o,55	o,5o	o,55
Behandlungszyklus				
1	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
2	"	<o,3o	<o,3o	<o,3o
3	"	o,95	2,o5	1,oo
4	"	o,7o	o,8o	o,75

Fortsetzung Tab. 13

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Behandlungszyklus				
5	8.oo	1,9o	1,75	1,85
6	"	2,7o	2,95	2,85
7	"	3,9o	4,1o	4,oo
7	2o.oo	4,oo	4,25	4,15
8	8.oo	4,3o	3,55	3,95
8	2o.oo	4,oo	3,6o	3,8o
9	8.oo	5,oo	5,2o	5,1o
9	2o.oo	3,45	3,55	3,5o
1o	8.oo	4,3o	5,2o	4,75
1o	12.oo	4,9o	5,3o	5,1o
1o	16.oo	5,4o	4,4o	4,9o
1o	2o.oo	3,5o	3,15	3,35
1o	24.oo	4,55	5,25	4,9o
11	4.oo	7,15	7,5o	7,35
11 +)	8.3o	4,4o	4,2o	4,3o
11	1o.oo	3,3o	3,5o	3,4o
11	11.3o	4,15	4,15	4,15
11+)	13.3o	2.25	2,15	2,2o
11	15.3o	1,65	2,2o	1,95
11	18.3o	2,15	2,7o	2,45
11	21.3o	2,8o	2,1o	2,45
12+)	7.oo	2,6o	2,65	2,65
12	1o.oo	2,9o	3,65	3,3o
12	13.oo	3,35	3,45	3,4o
12	16.oo	2,6o	3,25	2,9o

Fortsetzung Tab. 13

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Behandlungszyklus				
13	8.oo	3,25	3,2o	3,25
13	16.oo	3,35	2,5o	2,95
14	8.oo	3,45	3,15	3,3o
14	16.oo	4,55	4,5o	4,55
15	8.oo	4,35	3,85	4,1o
15	16.oo	5,2o	4,8o	5,oo
16	8.oo	4,65	5,35	5,oo
16	16.oo	5,35	4,5o	4,95
17	8.oo	3,65	4,1o	3,9o
18	8.oo	o,65	o,9o	o,8o
19	8.oo	o,45	<o,3o	o,4o
2o	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
21	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
22	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
23	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
24	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
25	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o

+) Behandlung mit Anti-LH-Serum

In Tab. 14 sind die in den 8-Uhr-Proben ermittelten Werte einander gegenübergestellt.

Tab. 14

Kuh "Kafeil" : 8-Uhr-Werte

Vergleich der Progesteronkonzentrationen im Kontroll- und Behandlungszyklus

Zyklus-tag	ng Prog. / ml Plasma		
	Kontroll-zyklus	Behandlungs-zyklus	Differenz: Kontr.Zyk. - Beh.Zyk.
1	0,55	< 0,30	- 0,25
2	< 0,30	< 0,30	-
3	< 0,30	1,00	+ 0,70
4	0,45	0,75	+ 0,30
5	1,70	1,85	+ 0,15
6	3,25	2,85	- 0,40
7	2,80	4,00	+ 1,20
8	3,75	3,95	+ 0,20
9	4,95	5,10	+ 0,15
10	3,90	4,75	+ 0,85
11 x)	4,55	4,30	- 0,25
12 x)	3,70	2,65	- 1,05
13	4,60	3,25	- 1,35
14	6,50	3,30	- 3,20
15	4,25	4,10	- 0,15
16	5,85	5,00	- 0,85
17	7,35	3,90	- 3,45
18	5,75	0.80	- 4,95
19	0,90	0,40	- 0,50
20	0,55	< 0,30	- 0,25

x)Behandlung mit Anti-LH-Serum

Aus der Tab. 14 ergibt sich, daß die Werte des Behandlungszyklus nach der Antiserum-Verabreichung konstant niedriger liegen,als die Werte im Kontrollzyklus; dies ist vor der Behandlung nur bei 2 Werten der Fall.

Die planimetrische Auswertung ist in Tab. 15 angegeben.

Tab. 15

Kuh "Kafeil"; planimetrische Auswertung

Zyklusspanne	planimetrischer Wert (cm^2)			Abfall Beh. Zyklus (%)
	Kontr.Zyk.	Beh.Zyk.	Diff.	
Gesamtzyklus	131,6	1o8,6	23,o	17,5
Zyklus ab Tag 1o	91,9	65,5	26,4	28,8

Die Tab. 15 zeigt, daß sowohl bei der Auswertung des Gesamtzyklus, als auch der Werte ab dem 1o. Zyklustag, für den Behandlungszyklus erniedrigte Ergebnisse gemessen wurden, die um 17,5 % bzw. 28,8 % niedriger als im Kontrollzyklus liegen.
Für die gleichzeitig rektal ermittelten Eierstocks-Befunde ergab sich als Abweichung von bekannten physiologischen Abläufen am 18. Zyklustag die Atresie eines am 16. Tag des Behandlungszyklus palpierten Follikels. Erst am 22. Tag wurde am selben Ovar ein erneuter Follikel ermittelt, der nach 4 Tagen zur vollen Reife und Ovulation gelangte.

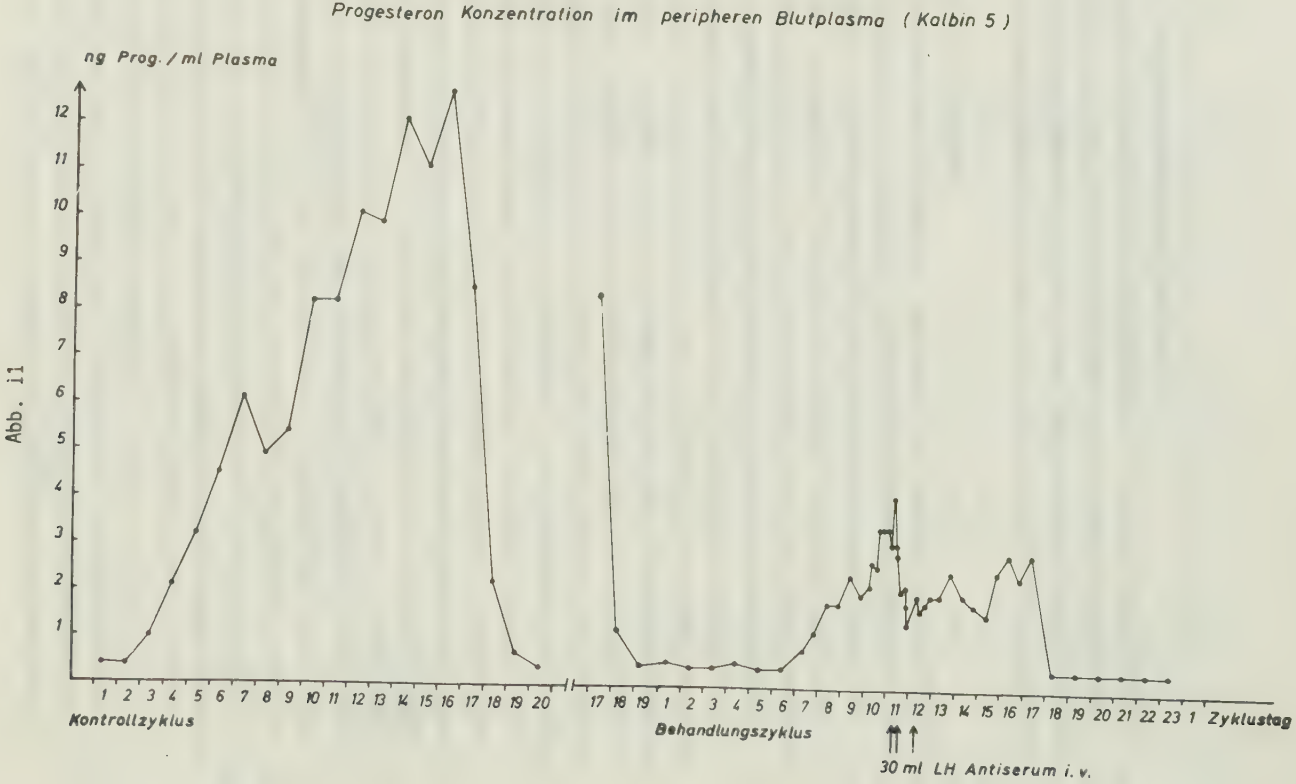

Progesteron Konzentration im peripheren Blutplasma (Kalbin 5)
ng Prog. / ml Plasma
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
17 18 19 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 1
Zyklustag
Kontrollzyklus
Behandlungszyklus
30 ml LH Antiserum i. v.

Abb. 11

Für die Kalbin 5 sind die Einzelwerte der Progesteronbestimmungen in Tab. 16 und als graphische Darstellung in Abb. 11 wiedergegeben. Bei diesem Tier kam die in Kap. 3.4.3. beschriebene radioimmunologische Progesteronbestimmung zur Anwendung.
Die sich ergebende Progesteronverlaufskurve zeigt das beim Rind bekannte Bild mit einem kontinuierlichen Anstieg auf Höchstwerte im zweiten Drittel des Zyklus, wobei ein Gipfelwert von 12,8o ng am 16.Tag erreicht wird. Anschließend kommt es zu einem steilen Abfall der Progesteronwerte, die am 2o. Zyklustag bereits außerhalb des Meßbereichs liegen (untere Meßgrenze des angewandten Bestimmungsverfahren:<o,4 ng/ml Plasma). In Kap. 3.2. (Durchführung des Tierversuchs) wurde schon darauf hingewiesen, daß bei diesem Versuchstier die Blutprobenentnahme 1 Tag vor Ende des Kontrollzyklus unterbrochen werden mußte. Die Blutentnahme konnte am 17. Tag des darauffolgenden Zyklus (Zwischenzyklus) wieder aufgenommen werden. Dabei ergab sich, wie in Tab. 16 und Abb.1o ersichtlich ist, für das Ende des Kontroll- und Zwischenzyklus ein nahezu identisches Bild. Im Behandlungszyklus bewegt sich die Verlaufskurve bis zum 6. Zyklustag an der unteren Meßgrenze (<o,4 ng) und zeigt erst ab dem 7. Tag einen relativ gleichmäßigen Anstieg zu einem Kulminationspunkt, der am 11. Tag um 7.3o Uhr bei 4,15 ng/ml Plasma liegt; unmittelbar danach wurde die erste Behandlung mit Antiserum durchgeführt. Bis zur 2. Behandlung mit Antiserum waren die Progesteronkonzentrationen auf 2,15 ng abgefallen. Nach einem weiteren Abfall auf 1,45 ng um 2o.3o Uhr des gleichen Tages, wurde am 12. Zyklustag um 7,3o Uhr unmittelbar vor der 3. Antiserum-Behandlung eine Konzentraktion von 2,1o ng / ml Plasma gemessen. In ähnlicher Größenordnung wurden die Werte bis zum 17. Tag ermittelt, an dem dann ein drastischer Abfall auf Konzentrationen unter o,4 ng erfolgt.

Beim Behandlungszyklus mit einer Zykluslänge von 23 Tagen, gegenüber dem 21 und 19 Tage dauernden Kontroll- bzw. Zwischenzyklus, kann auch hier von einer Zyklusverlängerung gesprochen werden. Unter Auslassung des Zwischenzyklus erfolgt eine Gegenüberstellung der 8-Uhr-Werte des Kontroll- und Behandlungszyklus in Tab. 17.

Tab. 16

Kalbin Nr. 5

Progesteronkonzentrationen im peripheren Blutplasma

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert2	Mittelwert
Kontrollzyklus				
1	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o
2	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o
3	8.oo	1,o5	1,1o	1,1o
4	8,oo	2,15	2,2o	2,2o
5	8.oo	3,35	3,o5	3,2o
6	8.oo	4,85	4,2o	4,55
7	8.oo	6,2o	6,1o	6,15
8	8.oo	5,15	4,7o	4,95
9	8.oo	5,25	5,6o	5,45
1o	8.oo	8,o5	8,45	8,25
11	8.oo	8,o5	8,45	8,25
12	8.oo	1o,45	9,95	1o,2o
13	8.oo	9,65	1o,25	9,95
14	8.oo	11,9o	12,45	12,2o
15	8.oo	1o,9o	11,5o	11,2o
16	8.oo	12,3o	13,3o	12,8o
17	8.oo	8,6o	8,6o	8,6o
18	8.oo	2,2o	2,3o	2,25
19	8.oo	o,75	o,7o	o,75
2o	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o

Fortsetzung Tab. 16

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Zwischenzyklus				
17	8.oo	8.2o	8,5o	8,35
18	8.oo	1,15	1,3o	1,25
19	8.oo	o,45	< o,4o	o,45
Behandlungszyklus				
1	8.oo	<o,4o	o,7o	o,55
2	8.oo	<o,4o	o,65	o,55
3	8.oo	<o,4o	< o,4o	<o,4o
4	8.oo	<o,4o	o,75	o,6o
5	8.oo	<o,4o	o,55	o,5o
6	8.oo	<o,4o	o,45	o,45
7	8.oo	o,9o	o,8o	o,85
7	2o.oo	1,25	1,15	1,2o
8	8.oo	1,65	2,oo	1,85
8	2o.oo	1,85	1,95	1,9o
9	8.oo	2,55	2,35	2,45
9	2o.oo	2,1o	2,1o	2,1o
1o	4.oo	2,2o	2,3o	2,25
1o	8.oo	2,9o	2,5o	2,7o
1o	12.oo	2,7o	2,6o	2,65
1o	16.oo	3,2o	3,65	3,45
1o	2o.oo	3,1o	3,8o	3,45
1o	24.oo	3,6o	3,35	3,5o
11	4.oo	3,35	2,85	3,1o
11[+)]	7.3o	4,15	4,1o	4,15

Fortsetzung Tab. 16

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Behandlungszyklus				
11	9.oo	3,o5	3,2o	3,15
11	1o,3o	2,85	2,95	2,9o
11+)	12.3o	2,o5	2,2o	2,15
11	14,3o	2,35	2,15	2,25
11	17.3o	1,9o	1,8o	1,85
11	2o.3o	1,4o	1,45	1,45
12+)	7.3o	2,15	2,o5	2,1o
12	1o.3o	1,75	1,75	1,75
12	13.3o	1,75	1,9o	1,85
12	16.3o	2,15	1,95	2,o5
13	8.oo	2,o5	2,o5	2,o5
13	16.oo	2,7o	2,35	2,55
14	8.oo	2,o5	2,1o	2,1o
14	16.oo	1,9o	1,75	1,85
15	8.oo	1,65	1,65	1,65
15	16.oo	2,65	2,45	2,55
16	8.oo	2,75	3,o5	2,9o
16	16.oo	2,45	2,5o	2,5o
17	8.oo	3,o5	2,85	2,95
18	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o
19	8.oo	o,5o	o,45	o,5o
2o	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o
21	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o
22	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o
23	8.oo	<o,4o	<o,4o	<o,4o

+) Behandlung mit Anti-LH-Serum

Tab. 17

Kalbin Nr. 5 : 8-Uhr Werte

Vergleich der Progesteronkonzentration im Kontroll- und Behandlungszyklus

Zyklustag	ng Prog. / ml Plasma		
	Kontrollzyklus	Behandlungs-zyklus	Differenz: Kontr.-Zyk.-Beh.Zyk.
1	<o,4o	o,55	+ o,15
2	<o,4o	o,55	+ o,15
3	1,1o	<o,4o	- o,7o
4	2,2o	o,6o	- 1,6o
5	3,2o	o,5o	- 2,7o
6	4,55	o,45	- 4,1o
7	6,15	o,85	- 5,3o
8	4,95	1,85	- 3,1o
9	5,45	2,45	- 3,oo
1o	8,25	2,7o	- 5,55
11 +)	8,25	4,15	- 4,1o
12 +)	1o,2o	2,1o	- 8,1o
13	9,95	2,o5	- 7,9o
14	12,2o	2,1o	-1o,1o
15	11,2o	1,65	- 9,55
16	12,8o	2,9o	- 9,9o
17	8,6o	2,95	- 5,65
18	2,25	<o,4o	- 1,85
19	o,75	o,5o	- o,25
2o	<o,4o	<o,4o	-

+) Behandlung mit Anti-LH-Serum

In Tab. 17 kann festgestellt werden, daß sämtliche Werte im Behandlungszyklus niedriger als im Kontrollzyklus sind. Es zeigt sich jedoch auch, daß abgesehen von den letzten beiden Zyklustagen, die Differenzen nach derBehandlung wesentlich höher liegen.

Das Ergebnis der auf planimetrischen Wege beurteilten Progesteron-produktion ist in Tab. 18 wiedergegeben.

Tab. 18

Kalbin Nr. 5; planimetrische Auswertung

Zyklus-spanne	planimetrischer Wert (cm^2)			Abfall Behandl.Zykl.(%)
	Kontroll.Zykl.	Behandl.Zykl.	Diff.	
Gesamtzykl.	224,1	52,6	171,5	76,5
Zyklus ab Tag 1o	159,5	39,6	119,9	75,o

Das Ergebnis in Tab. 18 zeigt, daß die im Behandlungszyklus gemessenen Werte um 76,5 % (Auswertung Gesamtzyklus) bzw. 75,o % (Auswertung ab dem 1o. Zyklustag) niedriger liegen, als im Kontrollzyklus.

Die rektale Untersuchung im Kontrollzyklus erbrachte keine Besonderheiten. Während des Behandlungszyklus konnte am linken Ovar zwischen dem 6. und 15. Tag ein Corpus luteum periodicum ermittelt werden, das zwischen dem 1o. und 12. Tage maximale Größe erreichte. Ab dem 16. Tag wurde an demselben Ovar ein Follikel palpiert, der jedoch am 19.Tag degenerierte. Erst ab dem 21. Tag entwickelte sich am gegenüberliegenden Ovar ein Follikel; eine Ovulation mit vorausgehender Brunst konnte 3 Tage später beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Progesteronbestimmungen bei der Kalbin Nr. 6 sind in Tab. 19 aufgeführt und werden in Abb. 12 graphisch dargestellt.

Auch bei der Kalbin Nr. 6 zeigen die Progesteronwerte im Kontrollzyklus einen relativ gleichmäßigen Anstieg zu Beginn des Zyklus, wobei allerdings schon am 1o. Tag ein erster Peak mit 9,7o ng/ml Plasma erreicht wird. Im zweiten Drittel des Kontrollzyklus liegen die Werte auch bei diesem Tier am höchsten und erreichen am 13. Tag einen zweiten Peak mit 9,55 ng. Ab dem 16. Tag setzt ein steiler Abfall der Progesteronwerte ein, die von 8,o5 ng auf Minimalwerte unter o,3 ng / ml Plasma am 19. Tag sinken und in dieser Höhe 5 Tage lang, bis zum 2. Tag des Behandlungszyklus verlaufen. Von diesem Zeitpunkt an beginnt mit einigen kleineren Schwankungen ein erneuter Anstieg der Werte ; ein erster Peak von 6,15 ng wird am 1o. Tag des Behandlungszyklus erreicht.
Auch bei diesem Tier werden, wie schon bei den anderen beschriebenen Tieren, durch die erhöhte Frequenz der Blutentnahmen kurzfristige Schwankungen der Progesteronkonzentrationen sichtbar. Die gemessenen Werte während der Behandlung mit Antiserum (11. und 12. Zyklustag) und danach bis zum 15. Tag,liegen durchschnittlich bei ca. 3,7o ng (mit einer Schwankungsbreite von 2,7o bis 4,45 ng). Nach dem 15.Tag (5,1o ng / ml Plasma) erfolgt hier ein allmählicher Abfall der Progesteronwerte, bis dann am 19. Tag die untere Meßgrenze erreicht ist. Die Werte verlaufen dann unverändert niedrig bis zum Zyklusende am 22. Tag.
Ähnlich wie bei der Kalbin Nr. 5 liegen auch bei diesem Tier alle Werte des Behandlungszyklus niedriger als im Kontrollzyklus (siehe Tab. 2o). Allerdings werden auch hier, wenn auch weniger deutlich, größere Differenzen nach der Behandlung gemessen.

Tab. 19

Kalbin Nr. 6

Progesteronkonzentrationen im peripheren Blutplasma

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Kontrollzyklus				
1	8.oo	o,35	< o,3o	o,35
2	8.oo	o,4o	o,7o	o,55
3	8.oo	1,7o	2,55	2,15
4	8.oo	2,85	2,95	2,9o
5	8.oo	5,55	5,oo	5,3o
6	8.oo	5,8o	4,95	5,4o
7	8.oo	5,15	4,75	4,95
8	8.oo	5,9o	6,oo	5,95
9	8.oo	6,95	6,7o	6,85
1o	8.oo	9,9o	9,5o	9,7o
11	8.oo	6,75	6,8o	6,8o
12	8.oo	8,1o	7,9o	8,oo
13	8.oo	9,3o	9,8o	9,55
14	8.oo	8,2o	7,8o	8,oo
15	8.oo	8,25	8,4o	8,35
16	8.oo	7,8o	8,3o	8,o5
17	8.oo	4,65	4,2o	4,45
18	8.oo	4,8o	4,4o	4,6o
19	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
2o	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
21	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
22	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o

Fortsetzung Tab. 19

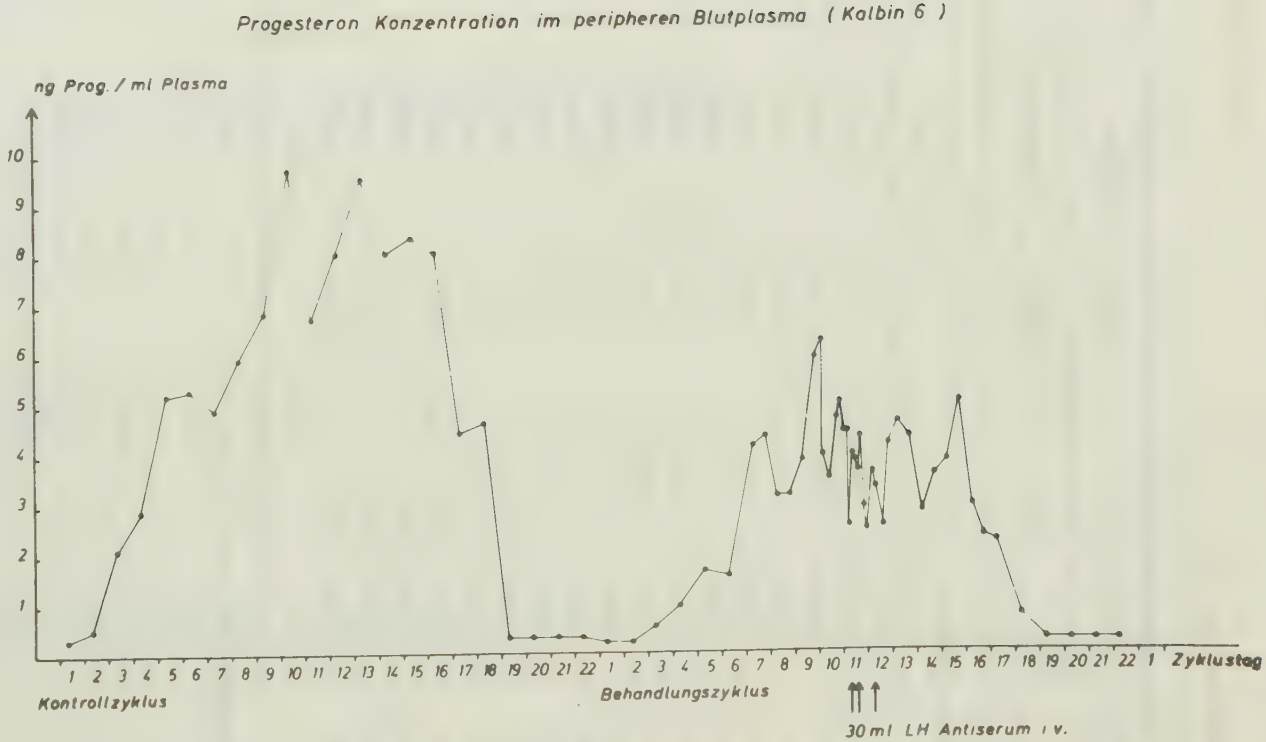
Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Behandlungszyklus				
1	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
2	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
3	8.oo	o,7o	o,4o	o,55
4	8.oo	1,o5	o,8o	o,95
5	8.oo	2,oo	1,4o	1,7o
6	8.oo	1,2o	1,8o	1,5o
7	8.oo	4,1o	4,25	4,2o
7	2o.oo	4,8o	3,95	4,4o
8	8.oo	3,3o	3,oo	3,15
8	2o.oo	3,oo	3,3o	3,15
9	8.oo	3,7o	3,95	3,85
9	2o.oo	5,65	6,15	5,9o
1o	4.oo	6,1o	6,4o	6,25
1o	8.oo	3,95	3,9o	3,95
1o	12.oo	3,35	3,65	3,5o
1o	16.oo	4,65	4,75	4,7o
1o	2o.oo	5,1o	5,o5	5,1o
1o	24,oo	4,55	4,25	4,4o
11	4.oo	4,2o	4,75	4,5o
11 +)	8.3o	2,65	2,55	2,6o
11	1o.oo	3,75	4,1o	3,95
11	11.3o	3,65	4,25	3,95
11 +)	13.3o	3,4o	3,95	3,7o
11	15.3o	4,25	4,65	4,45
11	18.3o	3,oo	2,85	2,95
11	21.3o	3,o5	2,3o	2,7o
12 +)	7.3o	3,55	3,75	3,65
12	1o.3o	3,2o	3,4o	3,3o

Fortsetzung Tab. 19

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Behandlungszyklus				
12	13.3o	2,7o	2,45	2,6o
12	16.3o	4,25	4,2o	4,25
13	8.oo	4,65	4,6o	4,65
13	16.oo	4,25	4,35	4,3o
14	8.oo	2,95	2,75	2,85
14	16.oo	3,65	3,35	3,5o
15	8.oo	3,95	3,75	3,85
15	16.oo	4,9o	5,25	5,1o
16	8.oo	3,o5	2,95	3,oo
16	16.oo	2,55	2,1o	2,35
17	8.oo	2,3o	2,3o	2,3o
18	8.oo	o,7o	o,7o	o,7o
19	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
2o	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
21	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
22	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o

+) Behandlung mit Anti-LH-Serum

Abb. 12


Progesteron Konzentration im peripheren Blutplasma (Kalbin 6)
ng Prog. / ml Plasma
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 1 Zyklustag
Kontrollzyklus
Behandlungszyklus
30 ml LH Antiserum i.v.

Tab. 2o

Kalbin Nr. 6 : 8- Uhr Werte

Vergleich der Progesteronkonzentration im Kontroll- und Behandlungszyklus

Zyklus-tag	ng Prog. / ml Plasma		
	Kontroll-zyklus	Behandlungs-zyklus	Differenz: Kontr. Zykl. - Beh. Zykl.
1	o,35	<o,3o	- o,o5
2	o,55	<o,3o	- o,25
3	2,15	o,55	- 1,6o
4	2,9o	o,95	- 1,95
5	5,3o	1,7o	- 3,6o
6	5,4o	1,5o	- 3,9o
7	4,95	4,2o	- o,75
8	5,95	3,15	- 2,8o
9	6,85	3,85	- 3,oo
1o	9,7o	3,95	- 5,75
11 +)	6,8o	2,6o	- 4,2o
12 +)	8,oo	3,65	- 4,35
13	9,55	4,45	- 4,1o
14	8,oo	2,85	- 5,15
15	8,35	3,85	- 4,5o
16	8,o5	3,oo	- 5,o5
17	4,45	2,3o	- 2,15
18	4,6o	o,7o	- 3,9o
19	<o,3o	<o,3o	-
2o	<o,3o	<o,3o	-
21	<o,3o	<o,3o	-
22	<o,3o	<o,3o	-

+) Behandlung mit Anti-LH-Serum

Ein klares Bild vermittelt die planimetrische Auswertung der graphischen Darstellung bei der sich, wie Tab. 21 zeigt, deutliche Unterschiede im Vergleich zum Kontrollzyklus ergeben.

Tab. 21

Kalbin Nr. 6; planimetrische Auswertung

Zyklus-spanne	planimetrischer Wert (cm^2)			Abfall
	Kontr.Zykl.	Beh. Zykl.	Diff.	Beh. Zykl. (%)
Gesamtzyklus	2o4,7	94,8	1o9,9	53,5
Zyklus ab Tag 1o	128,3	39.9	88,4	69,o

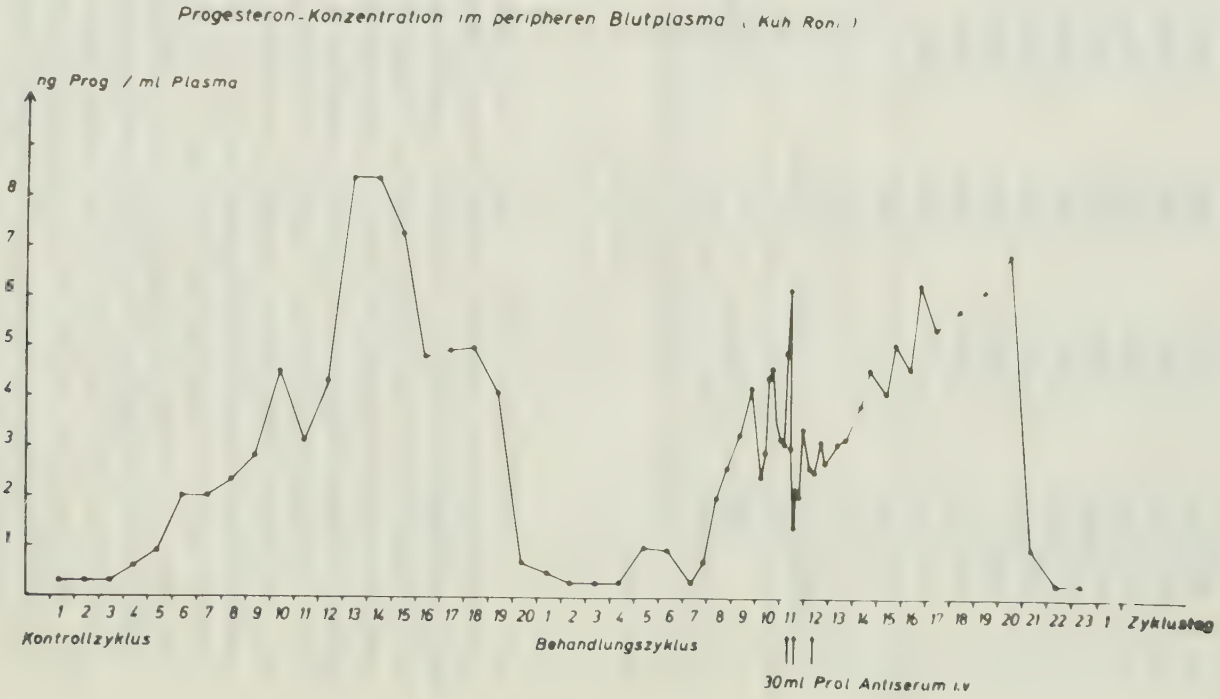
Während des Kontrollzyklus konnte bei diesem Tier am linken Ovar ab dem 17. Tag, neben einem in Rückbildung befindlichen Gelbkörper ein Follikel palpiert werden, der jedoch am 19. Tag atretisch wurde. Vom 19. Tag an entwickelte sich aber am rechten Ovar sehr rasch ein Follikel, der 4 Tage später zur Ovulation kam. Während des Behandlungszyklus wurden an den Ovarien keine Besonderheiten ermittelt, eine Zyklusverlängerung konnte nicht festgestellt werden.

4.2. Ergebnisse bei Anwendung eines Anti-Prolaktin-Serums

Versuche mit einem Anti-Prolaktin-Serum wurden bei der Kuh " Roni " und der Kalbin Nr. 4 durchgeführt.

Die bei der Kuh " Roni " ermittelten Progesteronwerte sind in Tab. 22 und als graphische Darstellung in Abb. 13 wiedergegeben.

Abb. 13


Progesteron-Konzentration im peripheren Blutplasma (Kuh Ron.)
ng Prog / ml Plasma
1
2
3
4
5
6
7
8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 1
Zyklustag
Kontrollzyklus
Behandlungszyklus
30ml Prol Antiserum i.v.

Im Kontrollzyklus zeigt der Verlauf der Progesteronwerte, wie aus Tab. 22 und Abb. 13 ersichtlich ist, den üblichen und relativ ausgeglichenen Anstieg zu Beginn des Zyklus. Zwischen Tag 12 und 13 erhöhen sich die Werte abrupt von 4,35 ng auf 8,45 ng / ml Plasma und sinken bis zum 16. Tag wieder auf 4,8o ng, bewegen sich noch 2-3 Tage in diesem Größenbereich und fallen schließlich zwischen 19. und 2o. Tag schnell auf o,75 ng / ml Plasma ab. Minimalwerte bei o,3 ng/ml Plasma wurden erst am 2.-4. Tag des Behandlungszyklus gemessen. Ein deutlicher Anstieg der Progesteronwerte beginnt im Behandlungszyklus erst am 7. Tag. Am 11. Tag wurde kurz nach der ersten Antiserum-Injektion ein Peak von 6,25 ng / ml Plasma gemessen, worauf die Werte innerhalb weniger Stunden auf einen vorübergehenden Tiefstpunkt von 1,5o ng zum Zeitpunkt der zweiten Antiserum-Injektion fallen. Es schließt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Progesteronwerte an, der am 16. Tag einen Höchstwert von 6,35 ng erreicht. Die Werte bewegen sich noch bis zum 2o. Tag in einem ähnlich hohen Bereich und fallen bis zum 22. Tag auf Minimalwerte ab.

Tab. 22

Kuh " Roni "

Progesteronkonzentrationen im peripheren Blutplasma

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Kontrollzyklus				
1	8.oo	o,3o	o,3o	o,3o
2	8.oo	o,3o	o,3o	o,3o
3	8.oo	o,3o	o,3o	o,3o
4	8.oo	o,65	o,55	o,6o
5	8.oo	o,9o	1,o5	1,oo
6	8.oo	2,o5	2,15	2,1o
7	8.oo	2,1o	1,95	2,o5
8	8.oo	2,2o	2,45	2,35
9	8.oo	3,oo	2,7o	2,85

Fortsetzung Tab. 22

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
1o	8.oo	4,45	4,65	4,55
11	8.oo	3.3o	3,oo	3,15
12	8.oo	4,35	4,4o	4,4o
13	8.oo	7,95	8,95	8,45
14	8.oo	8,7o	8,3o	8,5o
15	8.oo	7,2o	7,4o	7,3o
16	8.oo	4,25	5,35	4,8o
17	8.oo	5,o5	4,85	4,95
18	8.oo	5,55	4,55	5,o5
19	8.oo	4,3o	3,95	4,15
2o	8.oo	o,7o	o,85	o,8o
Behandlungszyklus				
1	8.oo	o,6o	o,45	o,55
2	8.oo	< o,3o	< o,3o	< o,3o
3	8.oo	< o,3o	< o,3o	< o,3o
4	8.oo	< o,3o	< o,3o	< o,3o
5	8.oo	1,15	o,85	1,oo
6	8.oo	1,2o	o,8o	1,oo
7	8.oo	< o,3o	< o,3o	< o,3o
7	2o.oo	o,6o	o,8o	o,7o
8	8.oo	1,95	2,1o	2,o5
8	2o.oo	2,4o	2,95	2,7o
9	8.oo	2,95	3,65	3,3o
9	2o.oo	3,85	4,7o	4,3o
1o	4.oo	2,45	2,45	2,45
1o	8.oo	2,75	3,o5	2,9o
1o	12.oo	4,4o	4,4o	4,4o

Fortsetzung Tab. 22

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Behandlungszyklus				
1o	16.oo	4,25	4,9o	4,6o
1o	2o.oo	3,55	3,4o	3,5o
1o	24.oo	3,2o	3,35	3,3o
11	4.oo	3,1o	3,2o	3,15
11 +)	8.oo	5,15	4,8o	4,95
11	9.3o	6,55	6,oo	6,3o
11	11.oo	2,85	3,3o	3,1o
11 +)	13.oo	1,3o	1,7o	1,5o
11	15.oo	2,45	2,oo	2,25
11	18.oo	2,2o	1,9o	2,o5
11	21.oo	3,45	3,35	3,4o
12 +)	8.oo	2,75	2,5o	2,65
12	11.oo	2,7o	2,3o	2,5o
12	14.oo	3,2o	3,25	3,25
12	17.oo	2,6o	2,95	2,8o
13	8.oo	3,oo	3,2o	3,15
13	16.oo	3,4o	3,oo	3,2o
14	8.oo	4,o5	3,8o	3,95
14	16.oo	4,4o	4,9o	4,65
15	8.oo	4,1o	4,1o	4,1o
15	16.oo	4,95	5,25	5,1o
16	8.oo	4,35	4,85	4,6o
16	16.oo	6,5o	6,2o	6,35
17	8.oo	5,15	5,65	5,4o
18	8.oo	5,5o	5,3o	5,4o
19	8.oo	6,35	6,1o	6,3o
2o	8.oo	7,25	6,55	6,9o
21	8.oo	1,25	o,85	1,o5
22	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
23	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o

+)Behandlung mit Anti-Prolaktin-Serum

Die im Kontroll- und Behandlungszyklus in den 8-Uhr-Proben ermittelten Progesteronwerte sind in Tab. 23 zusammengestellt.

Tab. 23

Kuh "Roni": 8-Uhr Werte

Vergleich der Progesteronkonzentrationen des Kontroll- und Behandlungszyklus.

Zyklustag	ng Prog. / ml Plasma		
	Kontroll-zyklus	Behandlungs-zyklus	Differenz: Kontr.Zykl. - Beh.Zykl.
1	<0,30	0,55	+ 0,25
2	<0,30	<0,30	-
3	<0,30	<0,30	-
4	0,60	< 0,30	- 0,30
5	1,00	1,00	-
6	2,10	1,00	- 1,10
7	2,05	<0,30	- 1,75
8	2,35	2,05	- 0,30
9	2,85	3,30	- 0,45
10	4,55	2,90	- 1,65
11 +)	3,15	4,95	+ 1,80
12 +)	4,40	2,65	- 1,75
13	8,45	3,15	- 5,30
14	8.50	3,95	- 4,55
15	7,30	4,10	- 3,20
16	4,80	4,60	- 0,20
17	4,95	5,40	+ 0,45
18	5,05	5,40	+ 0,35
19	4,15	6,30	+ 2,15
20	0,80	6,90	+ 6,10

+) Behandlung mit Anti-Prolaktin-Serum

Aus der Tab. 23 ist ersichtlich, daß im Behandlungszyklus nur in 3 Fällen vor der Behandlung höhere Progesteronwerte als im Kontrollzyklus gemessen wurden. Nach der Behandlung (am 11. und 12. Zyklustag) ergeben sich bei den 8-Uhr-Proben zunächst erheblich niedrigere Progesteronwerte, als im Kontrollzyklus. Ab dem 17. Zyklustag liegen die Werte im Behandlungszyklus jedoch wieder höher, als im Kontrollzyklus.
Das Ergebnis der planimetrischen Auswertung der Progesteronverlaufskurve zeigt, wie aus Tab. 24 ersichtlich, daß bei diesem Tier - im Gegensatz zu den Befunden bei Anwendung des Anti-LH-Serums - kaum ein Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungszyklus gemessen werden konnte. Der für den Behandlungszyklus ermittelte Wert unterscheidet sich von dem im Kontrollzyklus errechneten um weniger als 5 % respektive o,5 %.

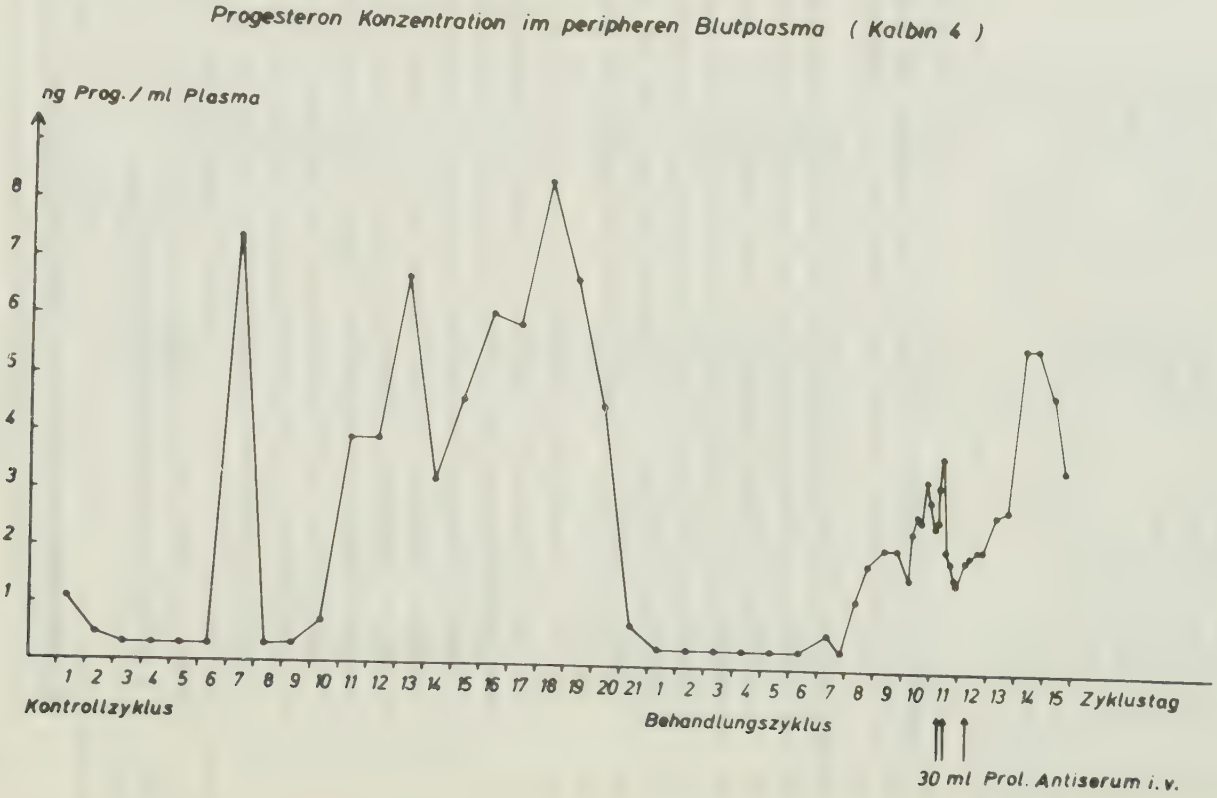
Tab. 24

Kuh " Roni "; planimetrische Auswertung

Zyklusspanne	planimetrischer Wert (cm^2)			Abfall (%)
	Kontr.Zykl.	Beh.Zykl.	Diff.	Beh. Zykl.
Gesamtzyklus	128,9	122,9	6,o	4,5
Zyklus ab Tag 1o	1o1,2	1o1,6	o,4	o,4

Die Befunde der rektalen Zykluskontrolle erbrachten im Kontrollzyklus keine Besonderheiten. Im Behandlungszyklus konnte am linken Ovar vom 11. - 16. Tag neben einem Gelbkörper ein deutlicher Follikel palpiert werden. Nach Atresie dieses Follikels, entwickelte sich am rechten Ovar ab dem 18. Tag rasch ein Follikel, 5 Tage danach erfolgte die Ovulation.

Abb. 14


Progesteron Konzentration im peripheren Blutplasma (Kalbin 4)
ng Prog./ml Plasma
8
7
6
5
4
3
2
1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 Zyklustag
Kontrollzyklus
Behandlungszyklus
30 ml Prol. Antiserum i.v.

Die Ergebnisse der Progesteronbestimmungen der Kalbin Nr. 4 sind in Tab. 25 aufgeführt, die graphische Darstellung dieser Werte ist in Abb. 14 wiedergegeben.

Wie schon in Kap. 3.2. erwähnt wurde, konnte bei der Kalbin 4 der Versuch nicht bis zum Ende durchgeführt werden, da das Tier am 15. Tag des Behandlungszyklus ausfiel.
Die Darstellung der Progesteronmeßergebnisse in Tab. 25 und Abb. 14 ergibt, im Gegensatz zum bisher gezeigten, ein unregelmäßiges Zyklusbild mit einem plötzlich auftretenden Peak von 7,4o ng am 7. Tag des Kontrollzyklus. Die Werte steigen dann nach einer zwischenzeitlichen Erhöhung auf 7,6o ng am 13. Tag auf einen Höchstwert von 8,4o ng / ml Plasma am 18. Tag, um dann gegen das Zyklusende hin wieder steil abzufallen, wodurch sich der bekannte Verlauf der Progesteronwerte im zweiten Drittel des Zyklus ergibt. Im Behandlungzyklus steigen die Werte erst ab dem 7. Zyklustag zu einem Peak von 3,8o ng am 11. Tag, kurz nach der ersten Antiserum-Injektion an.

Während der weiteren Antiserum-Behandlung liegen die Werte bei ca. 2 ng / ml Plasma. Am 13. Zyklustag ist ein plötzlicher Anstieg auf 5,6 ng zu messen. Ähnlich wie im Kontrollzyklus, jedoch um einen Tag verschoben, fallen hier die Werte am 14. Tag ab. Der letzte gemessene Wert am 15. Zyklustag (16 Uhr) liegt bei 3,5o ng / ml Plasma. An diesem Tag mußte das Tier aus dem Versuch genommen werden, so daß die Progesteronverlaufskurve nicht bis zum Zyklusende verfolgt werden konnte.

Aus Gründen der Vollständigkeit, sind auch bei diesem Tier, die in den 8-Uhr-Werten gemessenen Progesteronkonzentrationen in Tab. 26 einander gegenübergestellt.

Tab. 25

Kalbin Nr. 4

Progesteronkonzentraktionen im peripheren Blutplasma

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
1	8.oo	1,2o	o,9o	1,1o
2	8.oo	o,6o	<o,3o	o,45
3	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
4	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
5	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
6	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
7	8.oo	7,6o	7,2o	7,4o
8	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
9	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
1o	8.oo	o,5o	o,9o	o,7o
11	8.oo	3,95	3,9o	3,95
12	8.oo	4,45	3,4o	3,95
13	8.oo	6,95	6,45	6,7o
14	8.oo	3,3o	3,2o	3,25
15	8.oo	4,35	4,85	4,6o
16	8.oo	5,55	6,65	6,1o
17	8.oo	5,9o	6,o5	5,95
18	8.oo	8,9o	7,9o	8,4o
19	8.oo	7,1o	6,3o	6,7o
2o	8.oo	4,2o	5,1o	4,65
21	8.oo	o,75	o,7o	o,75
Behandlungszyklus				
1	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
2	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
3	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
4	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
5	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o
6	8.oo	<o,3o	<o,3o	<o,3o

Fortsetzung Tab. 25

Zyklus-tag	Uhrzeit	ng Prog. / ml Plasma		
		Wert 1	Wert 2	Mittelwert
7	8.oo	< o,3o	o,95	o,65
7	2o.oo	< o,3o	< o,3o	< o,3o
8	8.oo	1,oo	1,45	1,45
8	2o.oo	2,o5	1,65	1,85
9	8.oo	2,3o	1,95	2,15
9	2o.oo	1,95	2,45	2,2o
1o	4.oo	1,55	1,65	1,6o
1o	8.oo	2,5o	2,35	2,4o
1o	12.oo	3,o5	2,45	2,75
1o	16.oo	2,85	2,45	2,65
1o	2o.oo	3,45	3,35	3,4o
1o	24.oo	2,7o	3,2o	2,95
11	4.oo	2,8o	2,45	2,6o
11 +)	7.oo	2,4o	2,85	2,65
11	8.3o	3,65	2,9o	3,3o
11	1o.oo	3,65	3,95	3,8o
11 +)	12.oo	2,2o	2,o5	2,15
11	14.oo	1,95	1,95	1,95
11	17.oo	1,4o	1,8o	1,6o
11	2o.oo	1,6o	1,45	1,55
12 +)	7.3o	2,oo	1,8o	1,9o
12	1o.3o	1,95	2,o5	2,oo
12	13.3o	2,1o	2,2o	2,15
12	16.3o	1,95	2,2o	2,1o
13	8.oo	2,65	2,9o	2,8o
13	16.oo	2,75	2,95	2,85
14	8.oo	5,2o	6,oo	5,6o
14	16.oo	5,9o	5,3o	5,6o
15	8.oo	5,2o	4,45	4,85
15	16.oo	3,55	3,55	3,55

+) Behandlung mit Anti-Prolaktin-Serum

Tab. 26

Kabin Nr. 4 : 8- Uhr-Werte

Vergleich der Progesteronkonzentrationen des Kontroll- und Behandlungszyklus

Zyklustag	ng Prog. / ml Plasma		
	Kontroll-zyklus	Behandlungs-zyklus	Differenz: Kontr.Zykl. - Beh.Zykl.
1	1,1o	<o,3o	- o,8o
2	o,45	<o,3o	- o,15
3	<o,3o	<o,3o	-
4	<o,3o	<o,3o	-
5	<o,3o	<o,3o	-
6	<o,3o	<o,3o	-
7	7,4o	o,65	- 6,75
8	<o,3o	1,45	+ 1,15
9	<o,3o	2,15	+ 1,85
1o	o,7o	2,4o	+ 1,7o
11 +)	3,95	2,65	- 1,3o
12 +)	3,95	1,9o	- 2,o5
13	6,7o	2,8o	- 3,9o
14	3,25	5,6o	+ 2,35
15	4,6o	4,85	+ o,25

+) Behandlung mit Anti-Prolaktin-Serum

Klare Tendenzen lassen sich aus Tab. 26 nicht erkennen. Sowohl vor, als auch nach der Behandlung konnten im Behandlungszyklus höhere Werte als im Kontrollzyklus gemessen werden.

Wegen der eigenartigen Progesteron-Verlaufskurve im Kontrollzyklus und des unvollständigen Behandlungszyklus, erscheint es daher nicht sinnvoll, einen Versuch zur planimetrischen Erfassung der graphisch dargestellten Progesteronwerte durchzuführen.

Bei der rektalen Untersuchung wurde im Kontrollzyklus am rechten Ovar vom 8. bis 18. Tag ein Follikel beobachtet, der am 19. Tag degenerierte, sich am 2o. Tag jedoch plötzlich vergrößerte und am 1. Tag des Behandlungszyklus, also 2 Tage später, ovulierte. Das Corpus luteum periodicum des Kontrollzyklus konnte vom 8. bis 15. Tag (Hochblüte vom 1o.-12. Tag) am linken Ovar palpiert werden. Während des Behandlungszyklus entwickelte sich ab dem 7. Tag am linken Ovar, obwohl die Ovulation am rechten Ovar festgestellt wurde, ein Gelbkörper, der vom 11. - 13. Tag in Hochblüte stand. Ab dem 14. Tag entwickelte sich neben diesem Gelbkörper ein deutlicher Follikel. Eine Bestätigung dieses Befundes ergab sich bei der Kontrolle der Ovarien nach der Tötung des Tieres am 15. Tag.

Abschließend werden noch in Tab. 27 die bei den einzelnen Tieren beobachteten Zykluslängen während des Versuchs und den 5 vorhergehenden Zyklen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 27

Zykluslängen der Versuchstiere (in Tagen)

Zyklus	Kuh Kafeil	Kalbin 5	Kalbin 6	Kuh Roni	Kalbin 4
5	19	19	21	2o	21
4	19	2o	22	23	21
3	2o	21	2o	22	19
2	19	21	2o	21	21
1	21	19	19	25	18
Kontr.Zyk.	2o	21 +)	22	2o	21
Beh.Zykl.	25	23	22	23	-

+) Zwischenzyklus siehe Tab. 3, Seite 45

Wie aus der Tab. 27 ersichtlich ist, konnte bei 2 mit Anti-LH-Serum behandelten Tieren (Kuh " Kafeil und Kalbin Nr. 5) im Vergleich zu den vorausgehenden Zyklen eine Zyklusverlängerung um 2 bzw. 4 Tage festgestellt werden. Bei den beiden mit Anti-Prolaktin-Serum behandelten Tieren (Kuh "Roni" und

Kalbin Nr. 4) ist nur bei der Kuh "Roni" eine vergleichende Betrachtung der Zyklen möglich, der Behandlungszyklus dieses Tieres liegt jedoch innerhalb der Schwankungsbreite der vorausgehenden Zyklen.

5. D i s k u s s i o n

5.1. Diskussion der angewandten Methoden

Das in Kap. 3.4.2.2. beschriebene Verfahren zur Bestimmung von Progesteron im peripheren Blut des Rindes mit einer kompetitiven Proteinbindungsreaktion, weist in einigen Punkten wesentliche Unterschiede zu der von HOFFMANN und KARG (1969/197o) beschriebenen Methode auf, die ursprünglich zur Progesteronbestimmung herangezogen worden war. So konnte gezeigt werden (siehe Kap. 3.4.2.1.3.), daß auf eine Durchführung des dünnschichtchromatographischen Reinigungsschrittes verzichtet werden konnte, da vergleichende Messungen mit und ohne Dünnschichtchromatographie beinahe identische Werte ergaben. Durch diese Modifikation konnte der Aufarbeitungsgang jeder Probe beschleunigt werden. Ebenso konnte damit die Störquelle (siehe Kap. 3.4.2.1.3.), nämlich das Kieselgel, ausgeschaltet werden. Weitere Varianten waren die Einführung von dextranbeschichteter Holzkohle (statt Florisil) als Adsorbens zur Trennung der freien von den gebundenen Steroiden, sowie die getrennte Zugabe der Transcortinverdünnung und des radioaktiven Corticosterons zu den einzelnen Proben. Zumindest bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen wurden bei der getrennten Zugabe von Transcortin und ^{3}H-Corticosteron bessere Standardkurven erhalten; auch die zunächst auftretenden Probleme bei der Verwendung von dextranbeschichteter Holzkohle als Adsorbens konnten, insbesondere durch Einführung einer halbautomatischen Repetierspritze, gelöst werden, da es auf diese Weise gelang, den 48 Proben innerhalb weniger Sekunden die Kohlensuspension zuzusetzen. Ein großer Vorteil der beschriebenen modi-

fizierten Protein-Bindungsreaktion liegt auch darin, daß diese im Gegensatz zu dem ursprünglich von HOFFMANN und KARG (1969/197o) geschilderten Verfahren, bei dem 2 Personen notwendig waren, um eine identische Behandlung der Proben zu gewährleisten, von einer einzigen Person durchgeführt werden konnte.

Wie in Kap. 3.4.2.2.4. gezeigt werden konnte, verlief die Oberprüfung der Zuverlässigkeitskriterien (Reagentienleerwertbestimmungen, Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Wiederauffindung bekannter Progesteronmengen, Extraktionen unterschiedlicher Plasmavolumina) zufriedenstellend. Aus dem Ergebnisteil ist auch ersichtlich, daß die während der Kontrollzyklen gemessenen Progesteronkonzentrationen mit denen anderer Autoren übereinstimmen, wobei sowohl gaschromatographische, als auch kompetitive Proteinbindungsverfahren zur Anwendung kamen (POPE et al., 1969; STABENFELDT et al., 1969; DONALDSON et al., 197o; HOFFMANN und KARG, 1969/197o).

In einer Untersuchungsreihe (Kalbin Nr. 5) wurde Progesteron erstmals auf radioimmunologischem Wege gemessen, d.h. Transcortin wurde durch spezifisches Progesteron-Antiserum ersetzt. Für dieses radioimmunologische Bestimmungsverfahren gelten auch die für die angewandte kompetitive Proteinbindungsreaktion oben dargestellten beurteilenden Aussagen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Während die Bedeutung von LH, als auch ähnlicher Gonadotropine (HCG, PMSG), für die Progesteronsynthese im Gelbkörper beschrieben werden konnte, liegen für Prolaktin, speziell für die Spezies Rind nur wenige Befunde vor (siehe auch Kap. 2.3.2. und 2.3.3.). In den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, einen Beitrag zu der Frage zu leisten, inwieweit endogenes LH, aber auch Prolaktin für die Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktionen notwendig sind.

Erste Versuche in dieser Richtung wurden bereits von KARG et al. (197o) unternommen, die nach Gabe von LH-Antiserum in 2 Fällen eine Erniedri-

gung des peripheren Progesteronblutspiegels messen konnten, wobei jedoch zwischen beiden Ergebnissen starke qualitative Unterschiede auftraten und ein Vergleich mit einem normalen Zyklus der betreffenden Tiere fehlte. In ähnlicher Versuchsanstellung konnten SNOOK et al., (1969) eine Gewichtsabnahme der Corpora lutea und damit eine Abnahme des gesamten Progesterongehaltes messen.

Wie aus Kap. 3.2. hervorgeht, wurde in den selbst durchgeführten Untersuchungen ein hochspezifisches LH-Antiserum an insgesamt drei - ein hochspezifisches Prolaktin-Antiserum an zwei weibliche Rinder, am 11. und 12. Zyklustag, verabreicht. Um eine bessere Objektivierung der Befunde zu ermöglichen, wurde die Dauer der 5 vorhergehenden Zyklen der behandelten Tiere,sowie die Progesteronverlaufskurven im peripheren Blut im Zyklus vor der Behandlung bestimmt. Um einen etwaigen Effekt der Antiserum-Behandlung möglichst deutlich zu erkennen, wurde der 11. und 12. Zyklustag gewählt, da zu diesem Zeitpunkt Erhöhungen des LH-Blutspiegels gemessen werden konnten (SCHAMS und KARG, 1969; SNOOK und HANSEL, 197o), denen von KARG et al. (1969) eine mögliche luteotrope Funktion zugeschrieben wurde.

Die durchgeführten Untersuchungen mit Anti-LH-Serum erbrachten in allen Fällen drastische Unterschiede im Vergleich zum Kontrollzyklus. Eine Objektivierung der Befunde wird jedoch dadurch erschwert, daß bei zwei Tieren im Behandlungszyklus, sowohl vor, als auch nach der Behandlung niedrigere Werte als im Kontrollzyklus gemessen wurden. Dabei zeigt sich aber auch, daß bei diesen beiden Tieren die festgestellten Differenzen nach der Behandlung größer werden (siehe Tab. 17, Seite 1oo und Tab. 2o, Seite 1o7). Aufgrund der individuellen Variationen im Progesteronblutspiegel, die besonders bei kurzfristig aufeinanderfolgenden Blutentnahmen offenkundig werden, erschien eine statistische Auswertung der Ergebnisse durch Vergleich der einzelnen Meßpunkte wenig sinnvoll. Es wurde daher versucht, durch planimetrische Auswertung der Progesteronverlaufskurven, einen Meßwert zu erhalten, der eine vergleichende Aussage über die Progesteronproduktion im Kontroll- und Behandlungszyklus zuläßt.

Bei der Anwendung von Anti-LH-Serum ergaben sich bei dieser Auswertung für den Behandlungszyklus erheblich niedrigere Werte, als für den Kontrollzyklus. Nach den im Ergebnisteil gezeigten Resultaten, wurden für den Behandlungszyklus Depressionen von 17,5 %, 76,5 %, 53,5 %, bei Berücksichtigung des Gesamtzyklus und von 28,8 %, 75,o %, 69,o % für den "Teilzyklus" (ab dem 1o. Tag) errechnet. Schließlich zeigt sich der Effekt der Behandlung auch sehr deutlich an Hand der graphischen Darstellung. Bei allen behandelten Tieren ist die Progesteron-Verlaufskurve deutlich abgeflacht und weist nach der Behandlung das Bild einer kraterförmigen Einbuchtung auf.

Auch die Befunde der rektalen Ovarkontrollen ergeben ein interessantes Bild: bei zwei Tieren (Kuh "Kafeil", Kalbin Nr. 5) wurde nämlich eine Follikelartresie am 18. bzw. 19. Tag des Behandlungszyklus, verbunden mit einer Zyklusverlängerung von ca. 2 bzw. 4 Tagen festgestellt. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von SNOOK et al. (1969) überein, die bei ähnlichen Versuchen ebenfalls Artresien der präovulatorischen Follikel, bei gleichzeitiger Zyklusverlängerung feststellen konnten.

Wie bereits mehrfach dargelegt, mußte eines der mit Anti-Prolaktin-Serum behandelten Tiere (Kalbin Nr. 4) am 15. Tag des Behandlungszyklus aus dem Versuch genommen werden. Eine einwandfreie Aussage im Vergleich zum Kontrollzyklus läßt sich zusätzlich deshalb nicht machen, da bei diesem Tier im Kontrollzyklus ein isolierter Progesteronpeak am 7. Tag gemessen wurde. - Ein ähnlicher Befund wurde bereits einmal von HOFFMANN und KARG (197o) bei einem Tier erhoben.
Die Progesteronverlaufskurve entsprach somit nicht dem, bei den übrigen Tieren festgestellten mehr oder weniger kontinuierlichen Verlauf, wie er auch von anderen Autoren beschrieben wurde. Dieses Tier wurde deshalb für eine weitere Beurteilung nicht mehr herangezogen. Bei dem zweiten mit Prolaktin-Anti-Serum behandelten Tier (Kuh " Roni"), könnte nach der graphischen Darstellung der Progesteronverlaufskurve auf eine Wirkung des Antiserums geschlossen werden, da kurz nach der Behandlung erniedrigte Progesteronwerte gemessen wurden. Allerdings ergibt sich auch zum gleichen

Zeitpunkt im Kontrollzyklus eine Senkung des Progesteronblutspiegels. Bei der planimetrischen Auswertung des Versuchsergebnisses, können aber bei diesem Tier zwischen dem Kontroll- und Behandlungszyklus keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Tab. 24, Seite 114).

Ein abschließendes Urteil hinsichtlich der physiologischen Aussage kann, aufgrund des geringen Tiermaterials, noch nicht gebildet werden. Ähnlich wie bei den Ergebnissen von KARG et al. (197o) und SNOOK et al. (1969), läßt sich jedoch auch aus den vorliegenden Untersuchungen eine luteotrope Wirkung von LH ableiten, was insbesondere aus Vergleichen mit dem Kontrollzyklus hervorgeht. Es war jedoch nicht möglich, durch Verabreichung von Anti-LH-Serum (am 11. und 12. Zyklustag), die gesamte Progesteronproduktion zu unterbinden; der aus unserer planimetrischen Methode resultierende Differenzbetrag ergab einen massiven Abfall von max. 75 %. Auch das Sistieren der Corpus luteum-Funktionen trat am Ende des Behandlungszyklus entsprechend, wie im Kontrollzyklus, ungefähr zwischen dem 17. und 19. Tag mit einem drastischen Abfall des Progesteronblutspiegels auf. Durch die Behandlung mit Anti-LH-Serum blieb also das bereits in Kap. 2.3.2.3. und 2.3.3. beschriebene luteolytische Prinzip unbeeinflußt. In diesem Zusammenhang könnte auch die Rolle der Östrogene diskutiert werden, da es ja auch bei den mit Anti-LH-Serum behandelten Tieren zu einer physiologischen Follikelanbildung kam. Daß bei 2 dieser Tiere Follikelartresien folgten, darf auf die blockierende Wirkung des noch wirksamen Anti-LH-Serums gegenüber dem präovulatorischen LH-Peak zurückgeführt werden, da gleichzeitig auch Zyklusverlängerungen festgestellt werden konnten. (Follikelatresien ohne Zyklusverlängerung sind auch "physiologischerweise" zu beobachten).
Bei der Applikation von Anti-Prolaktin-Serum konnten keine überzeugenden Unterschiede zwischen dem Kontroll- und Behandlungszyklus gefunden werden. Der bei der Kuh "Roni" gewonnene Eindruck einer Progesteronblutspiegelsenkung bedarf selbstverständlich weiterer Objektivierung.

So ist insbesondere die Wirkung von reinem Kaninchenserum zu klären. Derartige Kontrollversuche werden zur Zeit unternommen.

Bei der Applikation von so hohen Serumdosen wie in den vorliegenden Untersuchungen muß auch mit einer gewissen Stresswirkung und damit einer erhöhten Glucocorticoid-Freisetzung gerechnet werden. Auch eine Progesteronsekretionssteigerung adrenalen Ursprungs beim Stress ist nicht auszuschließen (siehe STOTT, 197o). Ob einem solchen gesteigerten Glucocorticoidspiegel, ähnlich wie in der Endphase der Gravidität des Rindes (SCHAMS et al., 1972; HOFFMANN et al., 1972 a/b), auch hier eine luteolytische Wirkung zugesprochen werden könnte, ist vorläufig noch nicht zu sagen.

Es erscheint ferner erwähnenswert, daß sich nach Abschluß der Experimentalarbeit, aufgrund der Verfügbarkeit eines spezifischen Prolaktin-Inhibitors (CB-154; Fa. Sandoz) neue Möglichkeiten zur Klärung der Fragestellung eröffnet haben; die Prolaktin senkende Wirkung des Präparates konnte von KARG et al. (1972) beim Rind erstmals nachgewiesen werden.

Der Fortsetzung der vorliegenden Arbeit gilt auch ein Teil der vom hiesigen Team inzwischen in Angriff genommenen Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Es wurden Antisera gegen LH an 3 und Antisera gegen Prolaktin an 2 weibliche Rinder am 11. und 12. Zyklustag verabreicht und die Beeinflußung der Corpus luteum-Funktionen an Hand des peripheren Progesteronspiegels gemessen. Parallel dazu wurden rektal Ovarbefunde erhoben. Zur Bestimmung von Progesteron kam eine modifizierte kompetitive Proteinbindungsreaktion in Anlehnung an das Verfahren von HOFFMANN und KARG (1969/197o) zur Anwendung. Die Modifikationen bestanden im wesentlichen im Wegfall der Dünnschichtchromatographie, in der Verwendung von dextranbeschichteter Holzkohle als Adsorbens an Stelle von Florisil, zur Trennung der freien von den gebundenen Steroiden und von Humanplasma statt Hundeplasma als Transcortinquelle.

In einer Versuchsreihe konnte erstmals ein radioimmunologisches Progesteronbestimmungs-Verfahren mit einem spezifischen Progesteron-Antiserum eingesetzt werden.

Die Wirkungsweise der Antisera gegen LH und Prolaktin wurden durch vergleichende Betrachtung des Progesteronblutspiegels in einem vorausgehenden physiologischen Zyklus (Kontrollzyklus) und dem Behandlungszyklus ermittelt. Es zeigte sich, daß nach Verabreichung des Anti-LH-Serums eine deutliche Senkung der Progesteronkonzentrationen, aber keine vollständige Ausschaltung der Gelbkörperfunktionen herbeigeführt wurden. Ferner wurden durch diese Behandlungen präovulatorische Follikelartresien, verbunden mit einer Zyklusverlängerung, bei 2 von 3 Tieren festgestellt.

Dagegen ergaben die Befunde bei Anwendung des Anti-Prolaktinserums bei einem Tier keine klaren Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungszyklus. Bei dem zweiten mit Prolaktin-Antiserum behandelten Tier war dieser Vergleich nicht möglich, da es kurz nach der Behandlung aus dem Versuch genommen werden mußte.

Die Ergebnisse, bei denen die luteotrope Wirkung von LH deutlich herausgestellt werden konnten, werden diskutiert.

6. Summary

Antisera against LH and prolactin were injected in 3 and 2 cows resp., on the 11th and 12th day of cycle. The influence on the corpus luteum functions was determined by measuring progesterone concentration in peripheral plasma. Ovarian functions were also controlled by rectal palpations. Referring to HOFFMANN and KARG (1969/197o), a modified competitive protein binding assay was applied for the determination of progesterone. These modifications consisted mainly in using dextranchoated charcoal as adsorbens (instead of Florisil) for the separation of free and bound steroids and human plasma (instead of dog plasma) as a source for transcortin. During the extraction procedure the originally described separation of progesterone by thinlayer chromatography could be omitted.

In a series of experiments a radioimmunological procedure for the determination of progesterone using a high specific antiserum could be applied for the first time.

The action of the applied antisera against LH and prolactin was evaluated by comparing the progesterone levels measured during a preceeding oestrous cycle (controll-cycle) with the values abtained during the following treatment cycle. It became obvious that after the application of the LH antiserum progesterone concentrations were significantly lowered, the corpus luteum function however was not completely inhibited. Furtheron, due to the treatment, in two out of three animals the preovulatoric follicle became artretic, combined with a prolongation of the oestrous cycle. On the other hand no differences between the controll and treatment cycle could be seen in one animal after application of the anti-prolactin-serum. No comparison was possible in the second animal treated with prolactin antiserum since - due to the loss of the animal - the experiment could not be brought to an end.
The results, showing a distinct luteotropic action of LH are discussed.

7. Literaturverzeichnis

Aakvaag A. 197o
Steroid formation in porcine ovarian tissue in vitro. The effect of human chorionic gonadotrophin
Acta Endocrinol. (Kbh.) 63, 441

Abraham G.E. 1969
Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17β
J. Clin. Endocrinol. 29, 866

Abraham G.E., Odell W. D., Purdy J. M. 197o
Solid-phase radioimmunoassay of estrogens in biological fluids.
In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2 nd Symposium
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 147, 332

Abraham G. E., Hopper K., Tulchinsky D., Swerdloff R. S., Odell W. D. 1971
Simultaneous measurement of plasma progesterone, 17-hydroxy-progesterone, and estradiol-17β by radioimmunoassay.
Analytical Letters 4, 325

Adams W. M. 1969
The elective induction of labor and parturition in cattle.
J. Am. vet. med. Ass. 154, 261

Ahmad N., Lyons W. R., Ellis S. 1969
Luteotrophic activity of rat hypophysial mammatrophin
Endocrinology 85, 378

Aldridge R. R., Barrett S., Brown J. B., Funder J. W., Goding J.R. Kaltenbach C. C., Mole B. J. 197o
The effect of prostaglandins on ovarian steroidogenesis in vivo.
J. Reprod. Fertil. 21, 369

Allen W. R. 1969
The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotropin.
J. Endocrinol. 43, 593

Amoroso E. C. 1948
Ovarian activity in the pregnant mare.
Nature (Lond.) 161, 355

Anderson L. L., Neal F. C., Melampy R. M. 1962
Hysterectomy and ovarian function in beef heifers.
Am. J. vet. Res. 23, 794

Anderson L.L., Bowerman A. M., Melampy R. M. 1965
Oxytocin on ovarian function in cyclic and hysterectomized heifers.
J. Anim. Sci. 24, 964

Anderson L. L., Leglise P. C., du Mesnil du Buisson F., Rombauts P. 1965
Interaction des hormones gonadotropes et de l'utérus dans le maintien du tissu lutéal ovarien chez la Truie.
C. R. Acad. Sci. 261, 3675

Anderson L. L., Dyck G. W.,Mori H., Henricks D. M., Melampy R. M. 1967
Ovarian function in pigs following hypophysial stalk transection or hypophysectomy.
Am. J. Physiol. 212, 1188

Anderson L. L., Oxenreider S. L. 1967
A technique for hypophysial stalk transection in the cow.
J. appl. Physiol. 23, 762

Anderson L. L., Bland K. P., Melampy R. M. 1969
Comparative aspects of uterine-luteal relationships.
Rec. Prog. Horm. Res. 25, 57

Armstrong D. T., Hansel W. 1959
Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin.
J. Dairy Sci. 42, 533

Armstrong D. T., Black D. L., Cone C. E. 1964
Metabolic studies with active and involuting bovine corpora lutea.
Federation Proc. 23, 462

Armstrong D. T., Black D. L. 1966
Influence of luteinizing hormone in corpus luteum metabolism and progesterone biosynthesis through the bovine estrous cycle.
Endocrinology 78, 937

Armstrong D. T., Miller L. S., Knudsen K. A. 1969
Regulation of lipid metabolism and progesterone production in rat corpora lutea and ovarian interstitial elements by prolactin and luteinizing hormone.
Endocrinology 85, 393

Armstrong D. T., Knudsen K. A., Miller L.S. 197o
Effect of prolactin upon cholesterol metabolism and progesterone biosynthesis in corpora lutea of rats hypophysectomized during pseudopregnancy.
Endocrinology 86, 634

Aschheim S., Zondek B. 1927
Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren.
Klin. Wchnschr. 6, 1322

Asdell S. A. 1964
Patterns of mammalian reproduction.
2 nd. ed. Comstock Pupl. Ass. Ithaka Cornell University Press.

Astwood E. B. 1941
Regulation of corpus luteum function by hypophysial luteotropin.
Endocrinology 28, 3o9

Baba J., Matsuo H., Schally A. 1971
Structure of porcine LH- and FSH-releasing hormone
II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analysis.
Biochem. Biophys. Res. Com. 43, 459

Baird D. T., Uno A., McCracken J.A. 1969
Effect of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin on steroid secretion by the autotransplanted ovary of the ewe.
J. Endocrinol. 43, 19

Balfour W. E., Comline R. S., Short R. V. 1957
Secretion of progesterone by the adrenal gland.
Nature, (Lond). 18o, 148o

Barraclough C. A., Collu R., Massa R., Martini L. 1971
Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progestin concentrations in the rat: Effects of nembutal and exogenous gonadotrophins.
Endocrinology 88, 1437

Bartosik D., Romanoff E. B., Watson D. J., Scricco E. 1967
Luteotropic effects of prolactin in the bovine ovary.
Endocrinology 81, 186

Bassett J. M., Thornburn G. D. 1969
Foetal plasma corticosteroids and the initiation of parturition in sheep.
J. Endocrinol. 44, 285

Baulieu E. E., Jung I. 197o
A prostatic cytosol receptor.
Biochem. Biophys. Res. Com. 38, 599

Bayard F., Beitins I. L., Kowarski A., Migeon C. I. 197o
Measurement of plasma aldosterone by radioimmunoassay.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 31, 1

Beiser S. M., Erlanger B. F., Agate F. J., Liebermann S. 1959
Antigenicity of steroid-protein conjugates.
Science 129, 564

Beling C. G., Marcus S. L., Markham S. M. 197o
Functional activity of the corpus luteum following hysterectomy.
J. Clin. Endocrinol. 3o, 3o

Bettendorf G. 1963
Human hypophysial gonadotrophin in hypophysectomized women.
Int. J. Fertil. 8, 799

Bettendorf G., Knörr K., Stenner H. E. 1964
Gravidität nach Hypophysektomie und Behandlung mit hypophysärem Humangonadotropin.
Dtsch. med. Wchschr. 89, 1952

Betteridge K. J. 1971 a
Stimulation of rabbit ovaries by human chorionic gonadotrophin in the absence of endogenous gonadotrophins.
J. Endocrinol. 51, 499

Betteridge K. J. 1971 b
Inhibition of ovulation by an anti-pig-luteinizing hormone serum.
J. Endocrinol. 51, 5o5

Billiar R. B., Tanaka Y., Knappenberger M., Hernandez R., Little B. 1969
Influence of transcortin and albumin on the rate of reduction of progesterone by human placental 2oα- hydroxysteroid dehydrogenase.
Endocrinology 84, 1152

Bischoff F., Pilhorn H. R. 1948
The state and distribution of steroid hormones in biologic systems. III. Solubilities of testosterone, progesterone, and α- estradiol in aqueous salt and protein solution and in serum.
J. biol. Chem. 174, 663

Blatchley F. R., Donovan B. T. 1969
Luteolytic effect of prostaglandin in the guinea pig.
Nature (Lond). 221, 1o65

Bowerman A. M., Melampy R. M. 1962
Progesterone and Δ^4Pregnen-2oß-ol-3-one in bovine reproductive organs and body fluids.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 1o9, 45

Bowers C. Y., Schally A. V., Enzmann F., Bøler J., Folkers K. 197o
Porcine thyrotropin releasing hormone is (pyro) Glu-His-Pro (NH_2).
Endocrinology 86, 1143

Brink-Johnsen T., Benirschke K. 1968
The placenta
In: Endocrine Pathology, Chapter 15, p. 5o7
J. M. B. Bloodworth (ed. Williams & Wilkins, Baltimore)

Brinkley H. J., Norton H. W., Nalbandov A. V. 1964 a
Role of hypophysial luteotrophic substance in the function of porcine corpora lutea.
Endocrinology 74, 9

Brinkley H. J., Norton H. W., Nalbandov A. V. 1964 b
Is ovulation alone sufficient to cause the formation of corpora lutea.
Endocrinology 74, 14

Butenandt A. 1929
Ober Progynon, ein kristallisiertes weibliches Hormon.
Naturwissenschaften 17, 879

Butenandt A., Westphal U., Cobler H. 1934
Ober einen Abbau des Stigmasterins zu Corpus-luteum-wirksamen Stoffen, ein Beitrag zur Konstitution des Corpus-luteum-Hormons.
Ber. deut. chem. Ges. 67, 1611

Channing C. P. 1969
Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: effect of gonadotrophins and stage of cycle on steroidogenesis.
J. Endocrinol. 43, 415

Choudary J. B., Greenwald G. S. 1967
Effect of an ectopic pituitary gland on luteal maintenance in the hamster.
Endocrinology 81, 542

Clegg M. T., Boda T. M., Cole H. H. 1954
The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin.
Endocrinology 54, 448

Cole H. H., Saunders F. J. 1935
Concentration of gonad stimulating in blood serum and of estron in urine throughout pregnancy in the mare.
Endocrinology 19, 199

Cole H. H., 1938
High gonadotropic hormone concentration in pregnant ponies.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 38, 193

Cole H. H., Goss H. 1943
The source of equine gonadotropin.
In: " Essay in biology"
Univ. Calif. Berkeley Calif. 1o7

Cook B., Kaltenbach C. C., Norton H. W., Nalbandov A. V. 1967
Synthesis of progesterone in vitro by porcine corpora lutea.
Endocrinology 81, 573

Cook B., Kaltenbach C. C., Niswender G. D., Norton H. W., Nalbandov A. V. 1969
Short term ovarian responses to some pituitary hormones infused in vivo in pigs and sheep.
J. Anim. Sci. 29, 711

Cutuly E. 1942
Effects of lactogenic and gonadotrophic hormones on hypophysectomized pregnant rats.
Endocrinology 31, 13

Daughaday H. W. 1957
Corticosteroid binding by a plasma alpha globulin (abstract).
J. Clin. Invest. 36, 881

Daughaday H. W. 1958
Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroids and related hormones by human plasma and plasmaprotein fractions as measured by equilibrium dialysis.
J. Clin. Invest. 37, 511

Day E. D. 1966
Foundations of immunochemistry.
Williams and Wilkins Co., Baltimore

Deane H. W., Hay M. R., Moor R. M., Rowson L. E. A., Short R. V. 1966
Histochemical and electron microscopic features of ovine corpora lutea in relation to progesterone content.
2 nd Int. Congr. Hormonal Steroids Milan,
Excerpta Medica Foundation
Int. Congr. Ser. 111, 257

Denamur R., Martinet J. 1955
Effects de l'ovariectomie chez la brebis pendant la gestation.
C. R. Soc. Biol.(Paris) 149, 2105

Denamur R. 1968
Formation and maintenance of corpora lutea in domestic animals.
J. Anim. Sci. 27 (Suppl. I.) 163

Desclin L. 1948
Action de la prolactin sur la structure de l'ovaire du rat normal et hypophysectomisé.
C. R. Soc. Biol. (Paris) 142, 1436

Dhariwal A. P. S., Grosvenor C. E., Antunes-Rodrigues J., McCann S. M. 1968
Studies on the purification of ovine prolactin-inhibiting factor (PIF).
Endocrinology 82, 1236

Diczfalusy E. 1952
Progesterone in human placental tissue.
Acta Endocrinol., (Copenh.) 1o, 373

Döcke F., Dörner G., Voigt K. H. 1968
A possible mechanism of the ovulation-inhibiting effect of chlormadinone acetate in the rat.
J. Endocrinol. 41, 353

Doisy E. A., Veler C. D., Thayer S. A. 1929
Folliculin from urine of pregnant women.
Am. J. Physiol. 9o, 329

Domanski E.,Skrzeczkowski L., Stupnicka E., Fitko R., Dobrowolski W. 1967
Effect of gonadotrophins on the secretion of progesterone and oestrogens by the sheep ovary perfused in situ.
J. Reprod. Fertil. 14, 365

Donaldson L. E., Hansel W. 1965 a
Histological study of bovine corpora lutea.
J. Dairy Sci. 48, 9o5

Donaldson L.E., Hansel W. 1965 b
Prolongation of life span of the bovine corpus luteum by simple injections of bovine luteinizing hormone.
J. Dairy Sci. 48, 9o3

Donaldson L. E., Hansel W., Van Vleck L. D. 1965
Luteotropic properties of luteinizing hormone and nature of oxytocin induced luteal inhibition in cattle.
J. Dairy Sci. 48, 331

Donaldson L. E., Bassett J. M., Thornburn C. S. I. R. O. 197o
Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrus cycles, pregnancy and lactation and the effect of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration.
J. Endocrinol. 48, 599

Donovan B. T. 1971
The control of ovarian function.
Acta Endocrinol. (Copenh.) 66, 1

Dorfman R. I., Ungar F. 1965
Metabolism of steroid hormones.
Academic Press, New. York and London.

Doerr P. 1971
Schwierigkeiten beim Erreichen reproduzierbarer, hinreichend kleiner Leerwerte im Rahmen eines Hapten-Radioimmunoassay für E_2.
Bericht auf der Tagung: Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungsmethoden zur Bestimmung von Steroidhormonen.
Tagung, Schloß Auel, 12. u. 13. Nov. 1971.

Du Mesnil du Buisson F., Danzier L. 1957
Influence de l'ovariectomie chez la truie pendant la gestation.
C. R. Soc. Biol. (Paris) 161, 311

Du Mesnil du Buisson F., Leglise P. C. 1963
Effet de l'hypophysectomie sur les corps jaunes de lactation. Résultats préliminaires.
C. R. Acad. Sci. 257, 261

Du Mesnil du Buisson F., Leglise P. C., Anderson L. L., Rombauts P. 1964
Maintien des corps jaunes et de la gestation de la truie, au cours de la phase préimplantoire après hypophysectomie.
5 th Intern. Congr. Reprod. An. Insém. Artif. 3, 571

Eaton L. W. Jr., Hilliard J. 1971
Estradiol-17β, progesterone and 20α- hydroxypregn-4-en-3-one in rabbit ovarian venous plasma. I. Steroid secretion from paired ovaries with and without corpora lutea; Effect of LH.
Endocrinology 89, 1o5

Eckstein P. 197o
Mechanisms of action of intra-uterine contraceptive devices in woman and other mammals.
Brit. med. Bull. 26, 52

Edgar D. G., Ronaldson J. W. 1958
Blood levels of progesterone in the ewe.
J. Endocrinol. 16, 378

Eik-Nes K., Schellmann J. A., Lumry R., Samuels L. T. 1954
The binding of steroids to protein. I. Solubility determinations.
J. Biol. Chem. 2o6, 411

Eik-Nes K., Hall P. F. 1962
Isolation of dehydroepiandrosterone -^{14}C from dogs infused with cholesterol-4-^{14}C by the spermatic artery.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 111, 28o

El-Fouly M., Cook B. 1969
A controlling role of the oocyte on the function of granulosa cells.
51 st. Proc. Endocrine Soc., New York, p. 54

El-Fouly M., Cook B., Nekola M., Nalbandov A. V. 197o
Role of ovum in follicular luteinization.
Endocrinology 87, 288

Ellis S. 1961
Studies on the serial extraction of pituitary proteins.
Endocrinology 69, 554

Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Liebermann S. 1957
Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterisation of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and corticosterone.
J. Biol. Chem. 228, 713

Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Liebermann S. 1959
Steroid-protein conjugates. II. Preparation and characterisation of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone.
J. Biol. Chem. 234, 1o9o

Estergreen V. L. Jr., Frost O. L., Gomes W. R., Erb R. E., Bullard J. F. 1967
Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows.
J. Dairy. Sci. 5o, 1293

Everett J. W. 1944
Evidence suggesting a rôle of the lactognic hormone in the estrone cycle of the albino rat.
Endocrinology 35, 5o7

Everett J. W. 1964
Cental neural control of reproductive functions of the adenohypophysis.
Physiol. Rev. 44, 373

Exley D., Johnson M. W., Dean P. D. G. 1971
Antisera highly specific for 17ß-oestradiol.
Steroids 18, 6o5

Fantesil D. D., Edelman I. S. 1966
Characteristics of the renal nuclear receptors for aldosterone.
Prog. Nat. Acad. Sci.56, 872

Ferin M., Zimmering P. E., Liebermann S., Vande Wiele R. L. 1968
Inactivation of the biological effects of exogenous and endogenous estrogens by antibodies to 17ß-estradiol.
Endocrinology 83, 565

Fluhman C. F. 1929
Anterior pituitary hormone in the blood of women with ovarian deficiency.
J. Am. Med. Ass. 93, 672

Fraenkel L., Cohn F. 19o2
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Corpus luteum auf die Insertion des Eies.
Anat. Anz. 2o, 294

Frick J., Kincl A. F. 1969
The measurement of plasma testosterone by competitive protein binding assay.
Steroids 13, 495

Fuller G. B., Hansel W. 197o
Regression of sheep corpora lutea after treatment with antibovine luteinizing hormone.
J. Anim. Sci. 31, 99

Furuyama S., Nugent C. A. 1971
A. radioimmunoassay for plasma progesterone.
Steroids 17, 663

Gay V. L., Midgley A. R. Jr., Niswender G. D. 197o
Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation.
Federation Proc. 29, 188o

Gemzell C. A., Kjessler B. 1964
Treatment of infertility after partial hypophysectomy with human pituitary gonadotrophins.
Lancet 1964 I, No. 7334, 644

Ginther O. J., Woody C. O., Janakiraman K., Casida L. E. 1966
Effect of an intra-uterine plastic coil on the oestrous cycle of the heifer.
J. Reprod. Fertil. 12, 193

Gomes W. R., Erb R. E. 1965
Progesterone in bovine reproduction: A review.
J. Dairy Sci. 48, 314

Goodfriend L., Sehon A. H. 1958
Preparation of the estrone-protein conjugate.
Can. J. Biochem. Physiol. 36, 1177

Goodfriend L., Sehon A. H. 196o
Antigenicity of estrone-protein conjugates.
Nature (Lond) 185, 764

Goodfriend L., Sehon A. H. 1961 a
Antibodies to estrone-proteine conjugates.
I. Immunochemical studies.
Can. J. Biochem. Physiol. 39, 941

Goodfriend L., Sehon A. H. 1961 b
Antibodies to estrone-protein conjugates.
II. Endocrinological studies.
Can. J. Biochem. Physiol. 39, 961

Goodfriend L., Leznoff A., Sehon A. H. 1961
Antibodies to estrone-protein conjugates.
III. Tissue localization of estrogens.
Can. J. Biochem. Physiol. 39, 967

Goodfriend L., Sehon A. H. 197o
Early approaches to production, analysis and use of
steroid-specific antisera.
In: Immunological methods in steroid determination
Eds. Përon F. G. and Caldwell B. V.
Appleton-Century-Crofts, New York p. 15

Gorski J., Erb R. E., Dickson W. M., Butler H. C. 1958
Sources of progestins in the pregnant cow.
J. Dairy Sci. 41, 138o

Gospodarowicz D. 1969
Steroidogenic properties of gonadotrophins.
Acta Endocrinol. (Copenh.) 62, 39

Greenstein J. S., Murray R. W., Foley R. C. 1958
Effect of exogenous hormones on the reproductive processes
of the cycling dairy heifer.
J. Dairy Sci. 41, 1834

Greenwald G. S. 1967
Luteotropic complex of the hamster.
Endocrinology 80, 118

Grob C. A., Goldberg M. W. 1949
Darstellung künstlicher Komplex-antigene der Steroidreihe.
I. Diazotierbare Ester des Δ^5-Androst-3B, 17B-diols.
Helv. chim. Acta 32, 172

Gross S. J., Campell D. H., Weetall H. H. 1968
Production of antisera to steroids coupled to proteins directly through the phenolic A-ring.
Immunochem. 5, 55

Gross S. J. 1970
Specifities of steroid antibodies.
In: Immunological methods in steroid determination
Eds. Péron F. G. and Caldwell B. V.
Appleton-Century-Crofts, New York, p. 41

Grota L. J., Eik-Nes K. B. 1967
Plasma progesterone concentrations during pregnancy and lactation in the rat.
J. Reprod. Fertil. 13, 83

Grunert E., Esser J. 1971
Der Einfluß intrauteriner Jodinfusionen auf den Zyklus des Rindes.
Zuchthyg. 6, 79

Guériguian J., Pearlman W. H. 1968
Some properties of a testosterone-binding component of human pregnancy serum.
J. biol. Chem. 243, 5226

Gutknecht G. D., Wyngaarden L. J., Pharriss B. B. 1971
The effect of prostaglandin $F_2\alpha$ on ovarian and plasma progesterone levels in the pregnant hamster.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136, 1151

Hagerman D. D., Williams K. L. 1969
Comparison of a protein binding displacement method with a double isotope derivative method for determination of plasma progesterone.
Amer. J. Obstet. Gynec. 104, 114

Hallberg M. C., Zorn E. M., Wieland R. G. 1968
A sensitive testosterone assay by protein binding.
Steroids 12, 241

Hamburger C. 1931
Om Foskel paa Prolan fra Gravide og fra Kastrater
Uskr. Laeger,(Copenh.) 27, 27

Hammond J. Jr., Robson J. M. 1951
Local maintenance of the rabbit corpus luteum with oestrogen.
Endocrinology 49, 384

Hansel W. 1961
The hypothalamus and pituitary function in mammals.
Intern. J. Fertil. 6, 241

Hansel W. 1967
Studies on the formation and maintenance of the corpus luteum
In: "Reproduction in the female mammals". p. 346
(Lamming G. E. and Amoroso E. C. eds).
Butterworths & Co. Ltd., London, University of Nottingham

Hansel W., Snook B. S. 197o
Pituitary ovarian relationships in the cow.
J. Dairy Sci. 53, 945

Hanson F. W., Powell J. E., Stevens V. C. 1971
Effect of HCG and human pituitary LH on steroid secretion and functional life of the human corpus luteum.
J. Clin. Endocrinol. 32, 211

Haraszti J., Feher T., Baksai E. H. 1968
Excretion of pregnandiol by cows during cycle.
Acta Vet. Acad. Sci. Hungaricae Tomus 18, 373

Harms P. G., Niswender G. D., Malven P. V. 1969
Progesterone and luteinizing hormone secretion during luteal inhibition by exogenous oxytocin.
Biol. Reprod. 1, 228

Harris G. W., Jacobsohn D. 1952
Functional grafts of the anterior pituitary gland.
Prog. Roy. Soc.(Lond.) Ser. B 139, 263

Hawk H. W., Bolt D. J. 197o
Luteolytic effect of estradiol-17β when administered after midcycle in the ewe.
Biol. Reprod. 2, 275

Hayano M., Saba N., Dorfman R. I., Hechter O. 1956
Some aspects of the biogenesis of adrenal steroid hormones.
Rec. Prog. Horm. Res. 12, 79

Heap R. B., Linzell I. L. 1965
Plasma progesterone levels in the goat and mammary uptake during pregnancy.
J. Physiol. (Lond.) 18o, 1o

Henricks D. M., Oxenreider S. L., Anderson L. L. 1969
Ovarian function after hypophysial stalk transection in the cow.
Am. J. Physiol. 216, 1213

Henricks D. M., Dickey J. F., Niswender G. D. 197o
Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows.
Biol. Reprod. 2, 346

Herman T. S., Fimognari G. M., Edelman I. S. 1968
Studies on renal aldosterone-binding protein.
J. Biol. Chem. 243, 3849

Heyns W., Van Baelen H., De Moor P. 1969
Study of the specifity of the steroid binding ß-globulin in human plasma.
J. Endocrinol. 43, 67

Hinsey J. C. 1937
The relation of the nervous system to ovulation and other phenomena of the female reproductive tract.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 5, 269

Hisaw F. L., Astwood E. B. 1942
Physiology of the reproduction.
Ann. Rev. Physiol. 4, 5o3

Hoffmann W., Forbes T. R., Westphal U. 1969
Biologial inactivation of progesterone by interaction with corticosteroid binding globulin and with albumin.
Endocrinology 85, 778

Hoffmann B. 1971 a
Embryonaler Fruchttod bei einer Kuh im Anschluß an eine Nachbesamung - nachgewiesen mit Hilfe der Progesteronbestimmung im Blut.
Zuchthyg. 6, 134

Hoffmann B. 1971 b
Bestimmung von Östrogenen
In: Fortschritte der Klinischen Chemie
Enzyme und Hormone p. 491
Hrsgb.: Kaiser E., Verlag der Wiener Medizinischen Akademie 1972

Hoffmann B., Karg H. 1969
Determination of progesterone in bovine peripheral plasma by competitive protein-binding.
3. Symposium über Proteinbindung von Steroidhormonen in Leuven / Belgien.

Hoffmann B., Karg H. 197o
Determination of progesterone in bovine peripheral plasma by competitive protein-binding.
Ann. Endocrinol. 31, 823

Hoffmann B., Karg H. 1971 a
Erfahrungen mit der Verwendung eines internen Standards bei Anwendung der competitiven Proteinbindungsreaktion zur Bestimmung von Progesteron.
In: Fortschritte der Klinischen Chemie
Enzyme und Hormone S. 487
Hrsgb.: Kaiser E., Verlag der Wiener Medizinischen Akademie 1972

Hoffmann B., Karg H. 1971 b
Versuche zur Bestimmung von östrogenen Hormonen im peripheren Rinderblut mit einem radioimmunologischen Verfahren.
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 152, 55

Hoffmann B., Schams D., Karg H. 1972 a
Hormonveränderungen im Blut beim Rind in der peripartalen Phase.
VII. Int. Kongr. für tierische Fortpflanzung und Haustierbesamung München, Juni 72

Hoffmann B., Schams D., Karg H. 1972 b
Simultaneous determination of progesterone, total oestrogens, corticoids, prolactin, and LH in peripheral blood of the cow around partiturition.
Acta Endocrinol., (Copenh.) Suppl. 159, 82

Hohlweg W., Junkmann K. 1932
Die hormal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens.
Klin. Wchschr. II., 321

Horton R., Kato R., Sherins R. 1967
A rapid method for the estimation of testosterone in male plasma.
Steroids 10, 245

Houssay B.A., Biasotti A., Sammartino R. 1935
Modifications functionelles de l'hypophyse aprês les lêsions infundibulotubêriennes chez le capraud.
Compt. Rend. Soc. Biol. 120, 725

Hutchinson D. L., Westover J. L., Will D. W. 1962
The destruction of the maternal and fetal pituitary glands in subhuman primates.
Amer. J. Obstet. Gynec. 83, 857

Igarashi M., McCann S. M. 1964
A hypothalamic follicle stimulating hormone-releasing factor.
Endocrinology 74, 446

Illingworth D. V. 1969
Luteolytic and luteotrophic effects of oestrogen in the guinea-pig.
J. Reprod. Fertil. 18, 548

Jensen E. V., Jacobson H. I. 1960
Fate of steroid estrogens in target tissues.
In: Pincus G. and Vollmer E. P. Eds. p. 161
Biological activities of steroids in relation to cancer.
Academic Press Inc., New York

Jensen E. V., Jacobson H. I., Flesher J. W., Saha N. N., Gupta G. N., Smith S., Colucci V., Shiplacoff D., Neumann H. G., De Sombre E. R., Jungblut P. W. 1966
In: Pincus G., Nakao T. and Tait J. F. Eds.
Steroid Dynamics p. 133
Publ. Academic Press, New York

Jiang N. S., Ryan R. J. 1969
Radioimmunoassay for estrogens: A. preliminary communication.
Mayo Clin. Proc. 44, 461

Jöchle W. 1957
Exogene und endogene Einflüsse auf Tragezeitdauer und Geschlechtsverteilung der Nachkommen beim Pferd.
Zuchthyg. Fortpflanz.-Stör. Besam. Haustiere 1, 238

Johansson E. D. B. 1969
Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique.
Acta Endocrinol. (Copenh.) 61, 592

Johnson G. E., Challans J. S. 193o
Ovariectomy and corpus luteum extracts experiments in pregnant rats.
Anat. Rec. 47, 3oo

Jungblut P. W. 1971
Diskussionsbeitrag in: Methodik der Steroidtoxikologie
Eds.: Plotz E.J., Haller J. p. 49
Georg Thieme-Verlag Stuttgard

Jungblut P. W., Fischer I., Gaues J., Tykal P. 1970
Gewinnung, Charakterisierung und Anwendung von östrogenbindenden Antikörpern.
Symp. Dtsch. Ges. Endocrinol. 16, 412
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Kaltenbach C. C., Niswender G. D., Zimmerman D. R. Wiltbank J. N. 1964
Alteration of ovarian activity in cycling, pregnant, and hysterectomized heifers with exogenous oestrogens.
J. Anim. Sci. 23, 995

Kaltenbach C. C., Cook B., Niswender G. D., Nalbandov A. V. 1966
Progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro.
J. Anim. Sci. 25, 926

Kaltenbach C. C., Graber J. W., Niswender G. D., Nalbandov A. V. 1968
Luteotrophic properties of some pitiutary hormones in nonpregnant or pregnant hypophysectomized ewes.
Endocrinology 82, 818

Karg H. 1968
Endokrine Regelkreise der Fortpflanzung und deren willkürliche Steuerung.
Ztschft. f. Tierzücht. u. Züchtungsbiol. 84, 262

Karg H. 1970
Physiologische Grundlagen der Steuerung des Sexualzyklus.
D. Tierzüchter 22, 63

Karg H., Aust D., Böhm S., 1967
Versuche zur Bestimmung des Luteinisierungshormons (LH) im Blut von Kühen unter Berücksichtigung des Zyklus.
Zuchthygiene 2, 55

Karg H., Hoffmann B., Schams D. 1969
Verlauf der Blutspiegel an Progesteron, Luteinisierungshormon und Prolaktin während des Zyklus bei einer Kuh.
Zuchthygiene 4, 149

Karg H., Hoffmann B., Schams D. 197o
Luteinizing hormone, prolactin, and progesterone relation-ship in vivo (data from the cow).
Proceedings of the third International Congress,Hamburg, September 197o
Excerpta Medica International Congress Series No. 219
Hormonal Steroids p. 691

Karg H., Böhm S., Günzler O., Müller S. 1971
Erfahrungen über die Geburtseinleitung beim Rind mit Glukokortikoiden.
Dtsch. tierärztl. Wchschr. 78, 35

Karg H., Schams D. 197o a
Comparative aspects of pituitary regulatory pattern of sexual functions.
In: Mammalian Reproduction p. 88
Eds. Gibian H. and Plotz E. J.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Karg H.,Schams D. 197o b
Discussion on prolactin levels in the bovine blood under different physiological conditions.
In: Lactation p. 141
Proc. of an Intern. Symp., Forming the 17th Easter School in Agricult. Sci., University of Nottingham
Ed. Falconer I. R., Butterworths, London

Karg H., Schams D., Reinhardt V. 1972
Effects of 2-Br- α - ergocryptine on plasma prolactin level and milk yield in cows.
Experientia 28, 574

Karlson P. 197o
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Auflage

Karsch F. J., Cook B., Ellicott A. R., Foster D. L.,
Jackson G. L., Nalbandov A. V. 1971 a
Failure of infused prolactin to prolong the life
span of the corpus luteum of the ewe.
Endocrinology 89, 272

Karsch F. J., Roche J. F., Noveroske J. W., Foster D. L.,
Norton H. W., Nalbandov A. V. 1971 b
Prolonged maintenance of the corpus luteum of the ewe
by continuous infusion of luteinizing hormone.
Biol. Reprod. 4, 129

Keyes P. L., Nalbandov A. V. 1967
Maintenance and function of corpora lutea in rabbit
depend on estrogen.
Endocrinology 8o, 938

Keyes P. L., Armstrong D. T. 1968
Endocrine role of follicles in the regulation of corpus
luteum function in the rabbit.
Endocrinology 83, 5o9

Kido I. 1937
Die menschliche Plazenta als Produktionsstätte des soge-
nannten Hypophysenvorderlappenhormons.
Zbl. Gynäkol. 26, 1551

King L. F., Franks W. R. 1941
The conjugation of estrogens with protein.
J. Amer. chem. Soc. 63, 2o42

Kirton K. T., Pharriss B. B., Forbes A. D. 197o
Luteolytic effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in primates.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 133, 314

Klopper A. 1956
The excretion of pregnandiol during the normal menstrual cycle.
J. Endocrinol. 13, 291

Kolb E. 1967
Die Hormone
In: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere p. 59
Veb Gustav Fischer Verlag Jena, 2. Auflage

Kuss E., Goebel R. 1971
Synthese von Antiserum mit Östrogen als determinante Gruppe.
In: Fortschritte der Klinischen Chemie
Enzyme und Hormone p. 519
Hrsgb.: Kaiser E., Verlag der Wiener Medizinischen Akademie 1972

Kuss E., Goebel R. 1972
Determination of estrogens by radioimmunoassay with antibodies to estrogen-C6-conjugates.
I. Synthesis of estrone-, estradiol-17ß-, and estriol-6-albumin conjugates.
Steroids 19, 5o9

Landsteiner K. 1933
Die Spezifität der serologischen Reaktionen.
Berlin: Springer

Landsteiner K. 1945
Specifity of serological reactions.
Cambridge (Mass.): Harvard University Press

Lebeau M. C., Mercier-Bodard C., Olds J., Bourquin D., Brécy T., Raynaud J. P., Baulieu E. E. 1969
Mesure de la liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone, de la testostérone et de l'oestradiol à les protéines du plasma.
Ann. Endocrinol. 3o, 183

Le Maire W. J., Conly P. W., Moffett A., Spellacy W. N., Cleveland W. W., Savard K. 1971
Function of the human corpus luteum during the puerperium: Its maintenance by exogenous human chorionic gonadotropin.
Am. J. Obstet. Gynec. 110, 612

Liebermann S., Erlanger B. F., Beiser S. M., Agate F. J. 1959
Steroid-protein conjugates: Their chemical, immunochemical, and endocrinological properties.
Rec. Prog. Horm. Res. 15, 165

Liggins G. C. 1969
Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoids.
J. Endocrinol. 45, 515

Lindner H. R., Sass M. B., Morris B. 1964
Steroids in the ovarian lymph and blood of conscious ewes.
J. Endocrinol. 30, 361

Lindner H. R., Perel E., Friedlander A. 1970
Antibodies to oestrogens.
Transaction 4th Meeting of the International Study Group for Steroid Hormones, Rome, Dec. 1969, Research on Steroids.
Eds. Finkelstein M., Conti C., Klopper A.,
Pergamon Press, Oxford 4, 197

Lindner H. R., Perel E., Friedlander A., Zeitlin A. 1972
Specifity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier.
Steroids 19, 357

Linzell J.L., Heap R. B. 1968
A comparison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat; Sources of production and an estimation of uptake by some target organs.
J. Endocrinol. 41, 433

Lisk R. D. 196o
Estrogen-sensitive centers in the hypothalamus of the rat.
J. exp. Zool. 145, 197

Loewit K., Badaway S., Laurence K. A. 1969 a
Alteration of corpus luteum function in the pregnant rat by anti-luteinizing serum.
Endocrinology 84, 244

Loewit K., Laurence K. A. 1969 b
Termination of pregnancy in the rat with rabbit anti-bovine LH serum.
Fertil. Steril. 2o, 679

Loeb L. 1927
The effects of hysterectomy on the system of sex organs and on the periodicity of the sexual cycle in the guinea-pig.
Amer. J. Physiol. 83, 2o2

Lyons W. R., Simpson M. E., Evans H. M. 1943
Hormonal requirements for pregnancy and mammary development in hypophysectomized rats.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 52, 134

Maeda R., Okamoto M., Wegienka L. C., Forsham P. H. 1969
A clinically useful method for plasma testosterone determination.
Steroids 13, 83

Mainwairing W. I. P. 1969
A soluble androgene receptor in the cytoplasme of rat prostate.
J. Endocrinol. 45, 331

Malven P. V. 1969
Luteotrophic and luteolytic responses to prolactin in hypophysectomized rats.
Endocrinology 84, 1224

Malven P. V., Hansel W. 1964
Ovarian function in dairy heifers following hysterectomy.
J. Dairy Sci. 47, 1388

Malven P. V., Sawyer C. H. 1966
Formation of new corpora lutea in mature hypophysectomized rats.
Endocrinology 78, 1259

Marsh J. M.,Savard K. 1964
The activation af luteal phosphorylase by luteinizing hormone.
J. Biol. Chem. 239, 1

Marsh J. M., Telegdy G., Savard K. 1966
Effect of gonadotropins on steroid genesis in rat ovaries at dioestrous.
Nature (Lond.) 212, 95o

März J. E. 1971
Bestimmung von Progesteron im peripheren Rinderblut während verschiedener Phasen der Trächtigkeit.
Vet. med. Diss. München

Mason N. R., Savard K. 1964
Specifity of gonadotropin stimulation of progesterone in bovine corpus luteum in vitro.
Endocrinology 74, 664

Mayes D., Furuyama S., Kem D. C., Nugent C. A. 197o
A radioimmunoassay for plasma aldosterone.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 3o, 682

Mayes D., Nugent C. A. 1968
Determination of plasma testosterone by the use of competitive protein binding.
J. Clin. Endocrinol. 28, 1169

Mayes D., Nugent C. A. 197o
Plasma estradiol determined with a competitive Protein binding method.
Steroid 15, 389

McCann S. M., Taleisnik S., Friedman H. M. 196o
LH-releasing activity in hypothalamic extracts.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1o4, 432

McCann S. M., Dhariwal A. P. S., Porter J. C. 1968
Regulation of the adenohypophysis.
Ann. Rev. Physiol. 3o, 589

McCann S. M., Porter J. C. 1969
Hypothalamic pituitary stimulating and inhibiting hormones.
Physiol. Rev. 4o, 24o

McCracken J. A., Glew M. E., Scaramuzzi R. J. 197o
Corpus luteum regression induced by prostaglandin $F_{2\alpha}$.
J. Clin. Endocrinol. 3o, 544

Mc Donald J. G., Yoshinaga K., Greep R. O. 1971
Maintenance of luteal function in rats by rat prolactin.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 136, 687

Meites J., Webster H. D., Young F. W., Thorpe F. J., Hatch R. N. 1951
Effect of corpora lutea ablation and replacement therapy with progesterone on gestation in goats.
J. Anim. Sci. 1o, 411

Melampy R. M., Hearn W. R., Rakes J. M. 1959
Progesterone content of bovine reproductive organs and blood during pregnancy.
J. Anim. Sci. 18, 3o7

Mercier C., Alfsen A., Baulieu E. E. 1966
A testosterone binding globulin.
Excerpta Med. Intern. Congr. Ser. 101, 212

Midgley A. R. Jr., Niswender G. D., Ram J. S. 1969
Haptenradioimmunoassay: A general procedure for estimation of standard and other haptenic substances.
Steroids 13,731

Midgley A. R. Jr., Niswender G. D. 1970
Radioimmunoassay of steroids.
In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium
Acta Endocrinol. (Kbh). Suppl. 147, 320

Mikhail G., Wu C. H., Ferin M., Vande Wiele R. L. 1970
Radioimmunoassay of plasma and estradiol.
Steroids 15, 333

Milgrom E., Baulieu E. E. 1968
Liaison spécifique à une protéine dans l'utérus.
C. R. Acad. Sci. 267, 2005

Miller W. R., Turner C. W. 1963
Biosynthesis of steroids from pregnenolone-16-^{3}H by bovine ovarian tissue in vitro.
Steroids 2, 657

Mills R. C., Morrissette M. C. 1970
Progesterone synthesis by perfused bovine ovaries of early and late pregnancy.
J. Reprod. Fertil. 22, 435

Moor R. M., Hay M. F., Short R. V., Rowson L. E. A. 1970
The corpus luteum of the sheep: Effect of uterine removal during luteal regression.
J. Reprod. Fertil. 21, 319

Moore C. R., Price D. 1932
Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism.
Amer. J. Anat. 5o, 13

Mooser H., Grilichess R. K. 1941
Immunisierungsversuche mit Steroiden.
Schweiz. Z. allg. Pathol. Bakteriol. 4, 375

Moshang T. Jr., Rudd B. T., Eberlein W. R., Bongiovanni A. M. 197o
The measurement of plasma Δ^4-androstenedione by competitive protein binding.
Steroids 15, 195

Mougdal N. R. 1969
Effect of ICSH on early pregnancy in hypophysectomized pregnant rats.
Nauture (Lond.) 222, 286

Mougdal N. R., Madhwa Raj H. G., Jagannadho Rao A., Sairam M. R. 1969
Need of luteinizing hormone for maintaining early pregnancy in rat.
Indian. J. Exp. Biol. 7, 45

Murphy B. E. P. 1967
Some studies on the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay.
J. Clin. Endocrinol. 27, 973

Murphy B. E. P., Engelberg W., Pattee C. J. 1963
Simple method for the determination of plasma corticoids.
J. Clin. Endocrinol. 23, 293

Nalbandov A. V. 1963
Advances in neuroendocrinology.
Urbana, University of Illinois Press.

Nalbandov A. V. 1964
Hormone levels during pregnancy-Gonadotrophic hormones.
Reprod. Physiol. 2, 266

Nalbandov A. V. 197o
First Annual Carl. G. Hartman Lecture.
Comparative aspects of corpus luteum function.
Biol. Reprod. 2, 7

Neher G. M., Zarrow M. X. 1954
Concentration of progestin in the serum of the non-pregnant, pregnant and post partum ewe.
J. Endocrinol. 11, 323

Neill J. D., Johansson E. D. B., Datta J. K., Knobil E. 1967
Relationship between the plasma levels of luteinizing hormone and progesterone during the normal menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. 27, 1167

Nelson W. O., Pichette J. W. 1943
Maintenance of corpora lutea in hypophysectomized rats by lactogenic hormone.
Fed. Proc. 2, 36

Neri R. O., Tolksdorf S., Beiser S. M., Erlanger B. F., Agate F.J.Jr., Liebermann S. 1964
Further studies on the biological effects of passive immunization with antibodies to steroid-protein conjugates.
Endocrinology 74, 593

Niswender G. D., Kaltenbach C. C., Shumway R. P., Wiltbank J. N., Zimmerman D. R. 1965
Alteration of ovarian activity in cycling beef heifers with small, daily injections of oestradiol.
J. Anim. Sci. 24, 986

Niswender G. D., Midgley A. R. Jr. 197o
Hapten-radioimmunoassay for steroid hormones.
In: Immunological methods in steroid determination
Eds.: Pêron F. G. and Caldwell B. V.
Appleton-Century-Crofts, New York p. 149

Noteboom W. D., Gorski J. 1965
Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus.
Arch. Biochem. Biophys. 111, 559

Osinga A., Stegenga Th., Jöchle W. 1971
Initiation of paturition in dairy cows with a synthetic corticosteroid.
Zuchthyg. 6, 64

Papkoff H. 1969
In: " Reproduction in Domestic Animals"
Eds.: Cole H. H. and Cupps. P. T. p.7o
Academic Press, New York and London.

Pearlman W.H., Cerceo E. 1952
The isolation of progesterone from human placenta.
J. biol. Chem. 198, 79

Pharriss B. B., Wyngaarden L. J. 1969
The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the progestogen content of ovaries from pseudopregnant rats.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 13o, 92

Popa G. T., Fielding U. 193o
A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region.
J. Anat. (Lond.) 65, 88

Pope G. S., Gupta S.K., Munro K. B. 1969
Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows.
J. Reprod. Fertil. 2o, 369

Reeves B. D., De Souza M. L. A., Thompson I. E., Diczfalusy E. 1970
An improved method for the assay of progesterone by competitive protein binding.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 63, 225

Rice B. F., Hammerstein J., Savard K. 1964
Steroid hormone formation in the human ovary:
II. Action of gonadotropins in vitro in the corpus luteum.
J. Clin. Endocrinol. 24, 607

Robinson R. G., Fantesil D. D. 1970
Assay of aldosterone by competitive protein binding.
In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl.147, 275

Rosenfield R. L. 1969
Measuremant of plasma androstenedione.
Steroids 14, 241

Rüsse I. 1971
Größe des Corpus luteum und Follikelanbildung während der Gravidität beim Rind und Schaf.
Zuchthyg. 6, 126

Sachs H., Klopstock A. 1925
Die serologische Differenzierung von Lezithin und Cholesterin
Biochem. Z. 159, 491

Sammelwitz P. H., Aldred J. P.,Nalbandov A. V. 1961
Mechanism of maintenance of corpora lutea in pigs and rats.
J. Reprod. Fertil. 2, 387

Sandberg A., Rosenthal H., Slaunwhite W. R. Jr. 1968
Interaction of cortisol and progesterone with transcortin, albumin and unspecified proteins in pregnancy.
Excerpta Med. Int. Congr. Ser. No. 157, Abstract 4o2, p. 161

Savard K., Marsh J. M., Rice B. F. 1965
Gonadotropins and ovarian steroidogenesis.
Rec. Progr. Horm. Res. 21, 285

Schally A. V., Baba Y., Arimura A., Redding T. W. 1971
Evidence for peptide nature of LH and FSH-releasing hormone.
Biochem. Biophys. Res. Com. 42, 5o

Schams D. 1969
Radioimmunologische Bestimmung des Luteinisierungshormons (LH) im Blutserum von Kühen in den ersten zwei Monaten der Trächtigkeit.
Dtsch. tierärztl. Wchschr. 76, 567

Schams D., Karg H. 1969
Zeitlicher Verlauf und analytische Erfaßbarkeit des endogenen bzw. exogen erhöhten Blutspiegels an Luteinisierungshormon beim Rind.
Zuchthyg. 4, 61

Schams D., Karg H. 197o
Untersuchungen über Prolaktin in Rinderblut mit einer radioimmunologischen Bestimmungsmethode.
Zbl. Vet. Med. 17, 193

Schams D., Hoffmann B., Fischer S., März E., Karg H. 1972
Simultanous determination of LH and progesterone in peripheral bovine blood during pregnancy, normal and corticoid-induced parturition and post partum period.
J. Reprod. Fertil. 29, 37

Schmidt-Elmendorff H., Loraine J. A., Bell E. T., 1962
The effect of 6 M Urea on the follicle stimulating and luteinizing hormone activities of various gonadotropin preparations.
J. Endocrinol 24, 153

Schomberg D. W., Coudert S. P., Short R. V. 1967
Effects of bovine luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin on the bovine corpus luteum (in vivo).
J. Reprod. Fertil. 14, 277

Segaloff A. 1962
The gonadotropins
In: Methods in Hormone Research p. 591
Eds.: Dorman R. I. - Vol. II
Academic Press, New York and London

Seifart K. H., Hansel W. 1968
Some characteristics and optimum incubation conditions of in vitro progesterone synthesis by bovine corpora lutea.
Endocrinology 82, 232

Shemesh M., Ayalon N., Lindner H. R. 1968
Early effect of conceptus on plasma progesterone levels in the cow.
J. Reprod. Fertil. 15, 161

Shimizu K., Dorfman R. I., Gut M. 1960
Isocapronic acid a metabolite of 20α - hydroxycholesterol.
J. biol. Chem. 235, 25

Short R. V. 1956
Progesterone in placentae of domestic animals.
Nature (Lond.) 178, 743

Short R. V. 1957
Progesterone and related steroids in the blood of domestic animals.
Ciba Found. Coll. Endocrinol. 11, 362

Short R. V. 196o
Blood progesterone levels in relation to parturition.
J. Reprod. Fertil. 1, 61

Short R. V. 1967
Reproduction
Ann. Rev. Physiol. 29, 373

Short R. V., Moore N. W. 1959
Progesterone in blood. V. Progesterone and 2o ∝ - hydroxy-pregn-4-en-3-one in the placenta and blood of ewes.
J. Endocrinol. 19, 288

Short R. V., McDonald M. F., Rowson L. E. A. 1963
Steroids in the ovarian venous blood of ewes before and after gonadotrophic stimulation.
J. Endocrinol. 26, 155

Simmons K. R., Hansel W. 1964
Nature of the luteotropic hormone in the bovine.
J. Anim. Sci. 23, 136

Slaunwhite W. R. Jr.,Sandberg A. A. 1959
Transcortin, a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384

Smith P. E., Engle E. T. 1927
Experimental evidences regarding the role of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system.
Amer. J. Anat. 4o, 159

Smith V. R., McShan W. H., Casida L. E. 1957
On maintenance of the corpora lutea of the bovine with lactogen.
J. Dairy Sci. 40, 443

Snook R. B., Brunner M. A., Saatman R. R., Hansel W. 1969
The effect of antisera to bovine LH in hysterectomized and intact heifers.
Biol. Reprod. 1, 49

Spies H. G., Gier H. T., Wheat J. D. 1960
Maintenance of early pregnancy in ovariectomized gilts treated with gonadal hormones.
J. Anim. Sci. 19, 144

Spies H. G., Slyter A. L., Quadri S. K. 1967
Regression of corpora lutea in pregnant gilts administered anti-bovine LH in rabbit serum.
J. Anim. Sci. 26, 768

Spies H. G., Hilliard J., Sawyer C. H. 1968
Maintenance of corpora lutea and pregnancy in hypophysectomized rabbits.
Endocrinology 83, 354

Sprunt D. H., Dulaney A. D., Conger R. 1951
Methods of preparation and antigenic activity of estrogen-protein conjugates.
Cancer Res. 11, 282

Stabenfeldt G. H., Ewing L. L., McDonald L. E. 1969
Peripheral plasma progesterone levels during the bovine estrous cycle.
J. Reprod. Fertil. 19, 433

Stabenfeldt G. H., Osburn B. I., Ewing L. L. 197o
Peripheral plasma progesterone levels in the cow during pregnancy and parturition.
Am. J. Physiol. 218, 571

Staples R. E., Hansel W. 1961
Luteal function and embryo survival in the bovine.
J. Dairy Sci. 44, 2o4o

Stormshak F., Erb R. E. 1961
Progestins in bovine corpora lutea, ovaries, and adrenal during pregnancy.
J. Dairy Sci. 44, 31o

Stormshak F., Kelley H. E., Hawk H. W. 1969
Suppression of ovine luteal function by 17β-estradiol.
J. Anim. Sci. 29, 476

Stott G. H., Robinson J. R. 197o
Plasma corticosteroids as indicators of gonadotrophin secretion and infertility in stressed bovine.
J. Dairy Sci. 53, 652

Strott C. A., Yoshimi T., Ross G. T., Lipsett M. B. 1969
Ovarian physiology: Relationship between plasma LH and steroidogenesis by the follicle and corpus luteum; effect of HCG.
J. Clin. Endocrinol. 29, 1157

Sybulski S. 1971
Determination of free estradiol-17β levels in pregnancy plasma by competitive protein binding method.
Amer. J. Obstet. Gynec. 11o, 3

Talwalker P. K., Ratner A., Meites J. 1963
In vitro inhibition of pituitary prolactin synthesis and release by hypothalamic extract.
Amer. J. Physiol. 2o5, 213

Tausk M. 197o
Pharmakologie der Hormone p. 1o6
Georg Thieme-Verlag Stuttgart

Thibault C. 1966
Luteal maintenance in hypophysectomized and hysterectomized sheep.
J. Reprod. Fertil. (Suppl. 1) 63

Thorneycroft I. H., Tillson S. A., Abraham G. E., Scaramuzzi R. J., Caldwell B. V. 197o
Preparation and purification of antibodies to steroids.
In: Immunological methods in steroid determination.
Eds.:Pêron F. G. and Caldwell B. V.
Appleton-Century-Crofts, New York p. 63

Tillson S. A., Thorneycroft I. H., Abraham G. E., Scaramuzzi R. J., Caldwell B. V. 197o
Solid-phase radioimmunoassay of steroids.
In: Immunological methods in steroid determination.
Eds.: Pêron F. G. and Caldwell B. V.
Appleton-Century-Crofts, New York p. 127

Tobin C. E. 1942
Effects of lactogen on normal and adrenalectomized rats.
Endocrinology 31, 197

Tremblay R. R., Beitins I. Z., Kowarski A., Migeon C. J. 197o
Measurement of plasma dihydrotestosterone by competitive protein binding analysis.
Steroids 16, 29

Turnbull J. G., Kent G. C. Jr. 1966
Prolactin and luteotropic complex of hamsters.
Endocrinology 79, 716

Turner C. D. 1966
General Endocrinology
4 th Edition, Saunders W. B. Company, Philadelphia, London

Uchida K., Kadowaki M., Miyake T. 1969
Acute effects of various gonadotropins and other pituitary hormones on preovulatory ovarian progestin secretion in hypophysectomized rats.
Endocrinol. Japon. 16, 239

Venning E. 1957
A secretion of various hormones and the activity of the adrenal cortex in pregnancy.
In: Gestation
J. M. Jr. Foundation, New York

Vermeulen A., Verdonck L. 197o
Testosterone assay by competitive protein binding.
In: Steroid assay by protein binding
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 147, 239

Voss H. E. 196o
Die Hormone des Hypophysenvorderlappens.
In: Fermente, Hormone, Vitamine p. 557
Hrsgb.: Ammon R., Dirscherl W.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Weliky I., Engel L. L. 1962
17-hydroxypregnenolone as a precursor for cortisol.
Fed. Proc. 2o, 179

Westphal U. 1971
Effect of protein binding on hormonal activity of steroids.
In:Steroid-Protein Interactions p. 434
Eds.: Gross F., Labhart A., Mann T., Samuels L. T., Zander J.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York

Westphal U., Firschein H. E., Pearce E. M. 1955
Binding of hydrocortisone-4-C^{14} and progesterone-4-C^{14} to serum albumin, demonstrated by paper electrophoresis.
Science 121, 601

Westphal U., Forbes T. R. 1963
Biological inactivation of progesterone by binding to alpha-1 acid glycoprotein (orosomucoid).
Endocrinology 73, 504

White A., Catchpole H. B., Long C. N. H. 1937
A crystalline protein with high lactogenic activity.
Science 86, 82

Wiltbank J. N., Casida L. E. 1956
Alteration of ovarian activity by hysterectomy.
J. Anim. Sci. 15, 134

Wiltbank J. N., Rothlisberger J. A., Zimmerman D. R. 1961 a
Effect of human chorionic gonadotrophin on maintenance of the corpus luteum and embryonic survival in the cow.
J. Anim. Sci. 20, 827

Wiltbank J. N., Ingalls J. E., Rowden W. W. 1961 b
Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combination with gonadotropins on the estrous cycle of beef heifers.
J. Anim. Sci. 20, 341

Wislocki G. B., King L. S. 1936
The permeability of the hypophysis and the hypothalamus in vital dyes, with the study of the hypophysial vascular supply.
Am. J. Anat. 58, 421

Yalow R. S., Bernson S. A. 1959
Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature (Lond.) 184, 1648

Yoshimi T., Lipsett M. B. 1968
The measurement of plasma progesterone.
Steroids 11, 527

Yoshinaga K., Mougdal N. R., Greep R. O. 1971
Progestin secretion by the ovary in lactating rats: Effect of LH-antiserum, LH and prolactin.
Endocrinology 88, 1126

Zander J. 1960
Nachweis von Progesteron und 17 ∝ -Hydroxyprogesteron in hyperplastischen Nebenieren bei Adrenogenitalem Syndrom.
Klin. Wchschr. 38, 5

Zimmering P. E., Lieberman S., Erlanger B. F. 1967
Binding of steroids to steroid-specific antibodies.
Biochemistry 6, 154

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg bin ich für die freundliche Oberlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut zu besonderem Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Dr. B. Hoffmann für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

L e b e n s l a u f

Richard Rainer Bopp	geb. 2o.11.1944 in Straubing, als zweiter Sohn des selbstständigen Kaufmanns, Richard Bopp und seiner Ehefrau Frieda Bopp, geborene Löther;
Schulbildung	St. Anna Volksschule Augsburg, von 195o bis 1954; Private Höhere Lehranstalt Dr. H. Schönhärl und H. Wild in München-Pasing, von 1954 bis 1957; Holbein Oberrealschule Augsburg, von 1957 bis 1965; Abschluß: Reifeprüfung
Studium	Ludwig-Maximilian-Universität München, Studium der Tiermedizin von 1965 bis 197o (9 Sem.); Abschluß: Staatsexamen im November 197o
Bestallung zum Tierarzt	27. Juli 1971
Bisherige Tätigkeiten	Tierarzt-Praktikum bei Dr. Hamburger, Goldach von März bis Ende Mai 197o; wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan, von Jan. 1971 bis Ende. Jan. 1972, gleichzeitig Anfertigung der vorliegenden Dissertation.